

David P. Clark Nanette J. Pazdernik

Molekulare Biotechnologie

Grundlagen und Anwendungen



David P. Clark Nanette J. Pazdernik

Molekulare Biotechnologie

Grundlagen und Anwendungen

Aus dem Englischen übersetzt von Andreas Held und Birgit Jarosch

Titel der Originalausgabe: Biotechnology – Applying the Genetic Revolution

Die amerikanische Originalausgabe ist erschienen bei Elsevier Inc.

Copyright © 2009, Elsevier Inc. All rights reserved.

This edition of BIOTECHNOLOGY by David CLARK and Nanette PAZDERNIK is published by arrangement with ELSEVIER INC of 200 Wheeler Road, 6th floor, Burlington, MA 01803, USA

Aus dem Englischen übersetzt von Andreas Held und Birgit Jarosch

Wichtiger Hinweis für den Benutzer

Der Verlag, der Herausgeber und die Autoren haben alle Sorgfalt walten lassen, um vollständige und akkurate Informationen in diesem Buch zu publizieren. Der Verlag übernimmt weder Garantie noch die juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für die Nutzung dieser Informationen, für deren Wirtschaftlichkeit oder fehlerfreie Funktion für einen bestimmten Zweck. Der Verlag übernimmt keine Gewähr dafür, dass die beschriebenen Verfahren, Programme usw. frei von Schutzrechten Dritter sind. Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Buch berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften. Der Verlag hat sich bemüht, sämtliche Rechteinhaber von Abbildungen zu ermitteln. Sollte dem Verlag gegenüber dennoch der Nachweis der Rechtsinhaberschaft geführt werden, wird das branchenübliche Honorar gezahlt.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer ist ein Unternehmen von Springer Science+Business Media
springer.de

© Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009
Spektrum Akademischer Verlag ist ein Imprint von Springer

09 10 11 12 13 5 4 3 2 1

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Planung und Lektorat: Dr. Ulrich G. Moltmann, Dr. Meike Barth

Redaktion: Dr. Frank Lichert

Satz: TypoStudio Tobias Schaedla, Heidelberg

Umschlaggestaltung: SpieszDesign, Neu-Ulm

Umschlagbild: © 123rf – mtr (Hand mit Reagenzglas) / ©Tackley – Fotolia.com (Moleküle) / ©Kaulitzki – Fotolia.com (DNA)

ISBN 978-3-8274-2128-9

Dieses Buch ist Donna gewidmet
(David. P. Clark)

Dieses Buch ist meinen Kindern und meinem Mann gewidmet.
Ihre Geduld und ihr Verständnis haben mir die Zeit und Inspiration gegeben,
diesen Text recherchieren und zu schreiben
(Nanette J. Pazdernik)

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	IX
Danksagung	XI
Einleitung	XIII

Kapitel 1	Grundlagen der Biotechnologie	1
Kapitel 2	DNA, RNA und Protein	31
Kapitel 3	DNA-Rekombinationstechnologie	55
Kapitel 4	DNA-Synthese <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	87
Kapitel 5	RNA-Technologien	119
Kapitel 6	Immunotechnologie	167
Kapitel 7	Nanobiotechnologie	199
Kapitel 8	Genomik und Genexpression	225
Kapitel 9	Proteomik	263
Kapitel 10	Rekombinante Proteine	295
Kapitel 11	Protein-Engineering	317
Kapitel 12	Umweltbiotechnologie	335
Kapitel 13	Stoffwechsel-Engineering	353
Kapitel 14	Transgene Pflanzen und Pflanzenbiotechnologie	379
Kapitel 15	Transgene Tiere	405
Kapitel 16	Genetische Störungen	435
Kapitel 17	Gentherapie	455
Kapitel 18	Molekularbiologie von Krebs	475
Kapitel 19	Nichtinfektiöse Krankheiten	499
Kapitel 20	Altern und Apoptose	523
Kapitel 21	Bakterielle Infektionen	551
Kapitel 22	Virus- und Prion-Infektionen	567
Kapitel 23	Biologische Kriegsführung und Bioterrorismus	587
Kapitel 24	Forensische Molekularbiologie	613
Kapitel 25	Bioethik in der Biotechnologie	629
	Glossar	657
	Index	691

Vorwort

Biotechnologie hat die Welt verändert – dieser Aussage kann man ohne Zweifel zustimmen. Dank der Biotechnologie ist unser heutiger Wissensstand über die Ursachen vieler Erbkrankheiten so groß wie nie, und immer mehr Menschen können von einer immer geringeren landwirtschaftlichen Fläche ernährt werden. Die moderne Molekularbiologie und die Genetik haben unser Wissen über die Genome vieler Organismen, von Viren und Bakterien bis hin zu Bäumen und dem Menschen, stark erweitert. Und die Anwendung dieses Wissens hat die Wissenschaften revolutioniert und einen Wechsel von den beschreibenden Wissenschaften hin zu einer Vielzahl von Disziplinen eingeläutet, die schließlich zur Herstellung neuer Produkte wie Arzneistoffe, Impfstoffe und Nahrungsmittel führen.

Die Biotechnologie hat der Herstellung von Proteinen mit neuen Funktionen und sogar neuen biochemischen Synthesewegen mit veränderten Produkten Tür und Tor geöffnet. Eine logische Folge ist die Entwicklung von Kulturpflanzen und Tieren mit neuen Eigenschaften und auch, wie zu hoffen ist, die Heilung von Erbkrankheiten. Vor nicht allzu langer Zeit verließen sich Landwirte auf ihren Grünen Daumen, um gute Erträge zu erwirtschaften; doch auch in diesem Bereich hat die Gentechnik Einzug erhalten. Die Möglichkeit, Genome direkt zu verändern, bedeutet einschneidende Veränderungen in der Zukunft. Wird die Biotechnologie den sprichwörtlichen Jungbrunnen finden, indem sie die molekularen Vorgänge entschlüsselt, die uns altern oder Krebs entstehen lassen? Wird sie Einfluss auf Krankheits-therapien haben? Wird sie die Art der Kriegsführung durch die Entwicklung von neuen biologischen Kampfstoffen verändern?

Molekulare Biotechnologie erklärt wie Informationen aus der genetischen Revolution genutzt werden können und beantwortet einige dieser Fragen. Der Leser erhält einen Überblick über viele Wissenschaftsgebiete, deren ursprüngliches Spektrum durch die Biotechnologie verändert wurde. Die ersten Kapitel geben eine kurze und präzise Übersicht über die Grundlagen der Molekularbiologie wie DNA-Struktur, Genexpression und Proteinsynthese und über die Organismen, die in der biotechnologischen Forschung eingesetzt werden. Der Studierende wird

anschließend in die grundlegenden Methoden der Biotechnologie eingeführt. Kapitel 3 befasst sich mit der Isolierung von Nucleinsäuren, wie sie zunächst in künstliche genetische Vehikel kloniert und schließlich für ausführlichere Analysen in Modellorganismen eingeschleust werden. Die beiden folgenden Kapitel gehen ausführlicher auf die verschiedenen Methoden ein, die entwickelt wurden, um die Funktion von Genen zu untersuchen. Kapitel 4 hat die DNA zum Schwerpunkt und behandelt sowohl die *in vivo*- als auch die *in vitro*-Synthese von DNA und die Polymerasekettenreaktion. Kapitel 5 konzentriert sich dagegen auf die RNA. Hier werden Antisense-Technologie, RNA-Interferenz und Ribozyme erläutert. Die Kenntnis des in diesen Kapiteln vermittelten Wissens ist essenziell für das Verständnis des restlichen Lehrbuches.

Die verbleibenden Kapitel behandeln die unterschiedlichen Forschungsgebiete und geben Beispiele, wie die genetische Revolution diese Gebiete verändert hat. In Kapitel 6 werden aktuelle Verfahren zur Herstellung von Antikörpern für die genetische Forschung wie auch die Herstellung neuer Impfstoffe vorgestellt. Kapitel 7 vertieft dagegen ein anderes Gebiet – die Nanotechnologie. Außerdem wagt es einen Blick in die Zukunft der Molekularbiologie, in der Wissenschaftler in der Lage sein werden, im Nanomaßstab zu agieren. Thema ist die Anwendung von neuen Strukturen im Nanomaßstab für die gezielte Verabreichung von Arzneimitteln, die Identifizierung biologischer Moleküle *in situ* und die Herstellung antibakterieller Werkstoffe. Das Kapitel zeigt, wie die Nanobiotechnologie sich die selbstassoziierenden Eigenschaften der DNA zunutze macht, um Nanomaschinen herzustellen, und wie DNA die Gestalt von Proteinen physikalisch bestimmen kann. Dieses neue Forschungsgebiet ist mit der Molekularbiologie unmittelbar verbunden und wird in Kursen der Molekularbiologie zukünftig eine stärkere Gewichtung erhalten.

Der folgende Abschnitt schwenkt wieder zu den vertrauteren Gebieten der Genomik und Proteomik; im Mittelpunkt stehen hier der Anwendungsaspekt und die Bedeutung der Fortschritte in Genomik und Proteomik für die Medizin. Die Kapitel über die Proteomik befassen sich mit Methoden zur Isolierung

und Charakterisierung von Proteinen, einschließlich jüngster Entwicklungen in der Massenspektrometrie. Die Proteomik leitet zu einem Kapitel über, das einen Überblick darüber gibt, wie sich Proteine durch eine Expression in verschiedenen Organismen und Zellkulturen analysieren lassen. Es folgt die Herstellung von Proteinen mit neuen Eigenschaften durch deren gentechnische Modifikation.

Da einzelne gentechnisch modifizierte Proteine in ihrer Aussagekraft beschränkt sind, schlägt Kapitel 12 die Brücke zwischen dem Labor und der natürlichen Umgebung, in der die Proteine vorkommen, und befasst sich mit dem ständig wachsenden Gebiet der Metagenomik. Dieser Ansatz umgeht die herkömmlichen Methoden zur Identifizierung einzelner neuer Gene aus einem Modellorganismus. Stattdessen werden genomische Sequenzen direkt aus der Umgebung gewonnen, ohne den Organismus zu identifizieren, aus dem sie stammen. Die Untersuchung neuer Genfunktionen wird in Kapitel 13 fortgeführt. Biochemische Stoffwechselwege lassen sich mithilfe der DNA-Rekombinationstechnologie beeinflussen, und dieses Kapitel stellt ein paar dieser neuen Stoffwechselwege vor. Die Herstellung neuer Proteine und biochemischer Wege ist sinnlos, solange sie nicht in Pflanzen oder Tiere eingebracht werden können. Daher gehen die folgenden beiden Kapitel auf die jüngsten Fortschritte in der Herstellung transgener Pflanzen und Tiere ein.

Die folgenden Kapitel konzentrieren sich auf die Medizin. Zuerst vermittelt Kapitel 16 die molekulare Grundlage von vererbten Defekten. Dieses leitet zum nächsten Kapitel über, das sich mit der Gentherapie befasst. In weiteren Kapiteln geht es um die molekularen Grundlagen von Krebs und das Altern. Zudem wird eine Auswahl nichtinfektiöser Krankheiten präsentiert, wie die erektile Dysfunktion, Diabetes und die Fettleibigkeit. Und nicht zuletzt hat die Molekularbiologie unser Wissen über Erkrankungen, die von Viren und Bakterien verursacht werden, außerordent-

lich vergrößert. In den Kapiteln 21 und 22 erfährt der Studierende, wie Viren und Bakterien unsere zelluläre Maschinerie nutzen und Krankheiten auslösen. Auch werden jüngste Forschungsergebnisse über Prionenerkrankungen wie Rinderwahnsinn und die Creutzfeld-Jakob-Erkrankung behandelt. Kapitel 23 nimmt das Wissen über die Pathogenese bakteriell oder viral verursachter Erkrankungen zum Anlass und gibt einen Überblick über die biologische Kriegsführung und den Bioterrorismus.

Kapitel 24 umreißt den Einfluss der genetischen Revolution auf die Forensik. Die Möglichkeit einer Identifizierung von Straftätern mithilfe der Molekularbiologie hat den Strafvollzug grundlegend verändert. Bislang ungelöste Fälle lassen sich nun mithilfe von DNA-Tests untersuchen, die genauer und zuverlässiger sind, als die herkömmlichen Nachweisverfahren. Die Verwendung von DNA für kriminalistische Untersuchungen hat auch in Fernsehserien Einzug erhalten, die der Bevölkerung die Vorzüge dieser Verfahren nahe bringen. In diesem Kapitel werden allerdings nicht die Methoden thematisiert. Stattdessen geht es um die Frage, welche Folgen die Anwendung dieser Methoden für unsere Gesellschaft hat. Sollten wir die genetische Revolution nutzen, um Menschen zu klonen, Kulturpflanzen zu schaffen oder menschliche Stammzellen zu erforschen? Sollte die genetische Identität jedes Einzelnen der Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden?

Molekulare Biotechnologie zeigt auf, wie sehr technologischer Fortschritt und die Revolution der Molekularbiologie miteinander verwoben sind. Die Fähigkeit, große Datenmengen verarbeiten zu können, gepaart mit der detaillierten Analyse des menschlichen Körpers und dem anderer Organismen, hat unsere Gesellschaft und unsere Ethik bereits verändert. Dieses Buch gibt den Studierenden das Grundwissen über einige bereits vollzogene Veränderungen an die Hand, in der Hoffnung, dass sie dieses Wissen auf zukünftige Forschungen anwenden können.

Danksagungen

Wir möchten den folgenden Beteiligten an diesem Buch für die hilfreichen Informationen, die sie uns zur Verfügung gestellt haben, wie auch für die Verbesserungsvorschläge und ihren Einsatz danken: Laurie Achenbach, Rubina Ahsan, Phil Cunningham, Donna Mueller, Dan Nickrent, Holly Simmonds und Dave Pazdernik. Insbesondere danken wir Karen Fiorino für die Erstellung der meisten graphischen Darstellungen.

Einleitung

Die moderne Biotechnologie beruht auf Fortschritten in der Molekularbiologie und der Datenverarbeitung

Die traditionelle Biotechnologie reicht Tausende von Jahren in die Vergangenheit zurück. Sie umfasst die selektive Züchtung von Vieh und Kulturpflanzen genauso wie die Herstellung von alkoholischen Getränken, Milchprodukten, Papier, Seide und anderen natürlichen Produkten. Erst in den letzten Jahrhunderten entwickelte sich die Genetik als Forschungsgebiet und die jüngsten Fortschritte eröffneten die Möglichkeit zur Züchtung von Kulturpflanzen und Vieh durch wohl bedachte gentechnische Veränderung. Während der sogenannten „grünen Revolution“ in den Jahren zwischen 1960 und 1980 wurde das Wissen in der Genetik auf die natürliche Züchtung angewendet und hatte einen großen Einfluss insbesondere auf den Ertrag. Heutzutage werden zunehmend mehr Pflanzen und mittlerweile auch Tiere gentechnisch verändert.

Neue Pflanzenvarietäten wurden geschaffen und einige davon werden bereits landwirtschaftlich genutzt. Sie dienen dem Menschen als Nahrungsquellen und wurden verändert, um sie an Bedingungen anzupassen, für die sie zuvor nicht geeignet waren. Man entwickelte Kulturpflanzen mit Resistenzen gegen verschiedene Krankheitserreger, um den Ertrag zu erhöhen und die Kosten für den Anbau zu senken. Jedoch wird der Einfluss dieser gentechnisch veränderten Organismen auf andere Arten und die Natur zurzeit kontrovers diskutiert.

Die moderne Biotechnologie umfasst nicht nur die Genetik, sondern hier fließen auch neue Erkenntnisse aus anderen Wissenschaften ein. So wird der Umgang mit riesigen Datenmengen auch von Entwicklungen in der Datenverarbeitung beeinflusst. In der Tat wäre die Sequenzierung des menschlichen Genoms unmöglich gewesen, wenn vorher nicht leistungsfähigere Computer und eine entsprechende

Software entwickelt worden wären. Gelegentlich hört man Stimmen, die behaupten, wir befänden uns zwischen zwei wissenschaftlichen Revolutionen, die eine in der Informationstechnologie und die andere in der Molekularbiologie. Beide erfordern den Umgang mit großen Mengen an codierter Information. In einem Fall ist die Information mehr oder weniger vom Menschen geschaffen, im anderen Fall handelt es sich um genetische Information, die die Basis für das Leben ist.

Und noch ein weiteres Forschungsgebiet erlebt zurzeit eine Revolution – die Nanotechnologie. Die Entwicklung von Verfahren zur Sichtbarmachung und Manipulation einzelner oder weniger Atome eröffnet Möglichkeiten der immer detaillierteren Untersuchung von lebenden Systemen. Auf vielen Gebieten der Biotechnologie spielen Verfahren im Nanomaßstab eine zunehmend wichtigere Rolle.

Das führt zu der Frage nach der Definition der Biotechnologie, auf die es allerdings keine konkrete Antwort gibt. Vor etwa 30 Jahren hat man Brauereien und Bäckereien zur Biotechnologie gezählt. Heutzutage ist die Anwendung der modernen Genetik oder anderer äquivalenter moderner Technologien Voraussetzung, damit ein Verfahren der „Biotechnologie“ zugerechnet wird. Eine Definition des Begriffes ist daher teilweise zu einer Frage der jeweiligen Mode geworden. In diesem Buch betrachten wir die (moderne) Biotechnologie als einen Zusammenschluss aus klassischer Biotechnologie, moderner Genetik, Molekularbiologie, Computertechnologie und Nanotechnologie.

Das entstehende Forschungsgebiet ist außerordentlich groß und lässt sich schlecht abgrenzen. Es umfasst nicht nur die Landwirtschaft, sondern beeinflusst viele Bereiche der menschlichen Gesundheit und der Medizin, wie die Entwicklung von Impfstoffen und die Gentherapie. In diesem Lehrbuch haben wir einen Ansatz gewählt, der ausgehend von der genetischen Information als Basis aufzeigt, wie die Biotechnologie damit begonnen hat, in viele verwandte Forschungsgebiete vorzudringen.

Grundlagen der Biotechnologie

Beginn der biotechnologischen Revolution

Chemische Struktur von Nucleinsäuren

Verpackung von Nucleinsäuren

Bakterien als Arbeitspferde der Biotechnologie

Escherichia coli als Modellbakterium

Viele Bakterien enthalten Plasmide

Andere Bakterien in der Biotechnologie

Grundlagen der Genetik eukaryotischer Zellen

Hefe und andere filamentöse Pilze in der Biotechnologie

Kreuzungstypen der Hefe und Zellzyklus

Vielzellige Modellorganismen in der Forschung

Caenorhabditis elegans, ein kleiner Fadenwurm

Drosophila melanogaster, die Taufliege

Zebrafische sind Modellorganismen für die Entwicklungsgenetik

Mus musculus, die Maus, ist dem Menschen auf genetischer Ebene ähnlich

In vitro-Kulturen von tierischen Zellen

Arabidopsis thaliana, eine Blütenpflanze als Modellorganismus

Viren in der genetischen Forschung

Subvirale, infektiöse Agenzien und „genetische Einheiten“

Weiterführende Literatur

Beginn der biotechnologischen Revolution

Biotechnologie ist die Verwendung von lebenden Organismen für industrielle Prozesse. Sie wird insbesondere in der Landwirtschaft, bei der Herstellung von Lebensmitteln und in der Medizin eingesetzt. Seit Urzeiten macht sich der Mensch die Biotechnologie zunutze. Er begann mit der gezielten Veränderung seiner natürlichen Umgebung, um die Versorgung mit Nahrung, seine Behausung und seine Gesundheit zu verbessern. Doch die Nutzung der Biotechnologie ist nicht auf den Menschen beschränkt. Elefanten trinken beispielsweise vergorenen Fruchtsaft, um sich am Alkohol zu berauschen. Menschen stellen seit Jahrtausenden Wein, Bier, Käse und Brot her. All diese Prozesse beruhen auf Mikroorganismen, die die Ausgangssubstanzen verändern (Abb. 1.1). Seit Tausenden von Jahren wählen Bauern ertragreiche Kulturpflanzen aus und kreuzen diese miteinander. So wurden viele der heutigen Kulturpflanzen gezüchtet, die größere Früchte oder Samen tragen als ihre Vorfahren (Abb. 1.2).

Jüngste Fortschritte in der Molekularbiologie und in der Gentechnologie lassen uns annehmen, die Biotechnologie sei erst in heutiger Zeit entwickelt worden. Unsere Kenntnisse über Mikroorganismen, Pflanzen, Tierhaltung, den menschlichen Körper und die Natur sind außerordentlich erweitert worden, wodurch die Zahl und die Vielfalt an biotechnologisch hergestellten Produkten enorm zugenommen hat. Gesichtscremes enthalten Antioxidantien – um, wie uns glaubhaft gemacht wird, den Alterungsprozess aufzuhalten. Gentechnisch veränderte Pflanzen beinhalten fremde Gene. Die Genprodukte schützen sie vor schädlichen Insekten, wodurch sich der Ertrag bei gleichzeitig geringerem Einsatz von Insektiziden steigern lässt. Medikamente werden spezifischer und haben weniger Nebenwirkungen. Beim Insulin, das Diabetikern verabreicht wird, handelt es sich um menschliches Insulin, obwohl es von gentechnisch veränderten Bakterien synthetisiert wird. Nahezu jeder ist bereits in seinem Leben mit den jüngsten Fortschritten aus Genetik und Biochemie in Kontakt gekommen.

Mendels frühe Arbeiten beschrieben, wie erbliche Merkmale von einer Generation an die nächste weitergegeben werden; sie sind der Grundstein der modernen Genetik (s. Exkurs 1.1). Als nächstes folgte die Entdeckung der chemischen Substanz, aus der die Gene bestehen – die **DNA (Desoxyribonucleinsäure)**. Diese wiederum führte zu dem zentralen Dogma der Genetik, das besagt, dass die in der DNA gespeicherte

Information über das Zwischenprodukt **RNA (Ribonucleinsäure)** in Richtung der **Proteine** fließt und nicht umgekehrt. Diese Schritte sind universell und auf alle Organismen der Erde anwendbar. Sie sind derart flexibel, dass Leben in nahezu jeder verfügbaren Nische auf unserem Planeten möglich ist.

Biotechnologie beeinflusst das Leben eines jeden von uns und hat nahezu alles in unserem Leben verändert.



1.1 Traditionelle Biotechnologieprodukte

Brot, Käse, Wein und Bier werden auf der ganzen Welt seit Jahrhunderten mithilfe von Mikroorganismen wie Hefe hergestellt.



1.2 Teosinte versus heutigen Mais

Der Mensch begann sehr früh, Pflanzen gezielt zu züchten, um den Ertrag zu erhöhen. Teosinte (kleinerer Kolben und grüne Samen) gilt als Vorfahr heutiger kommerzieller Maissorten (größerer Kolben; dargestellt ist eine Varietät mit blauen Samen). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Wayne Campbell, Hila Science Camp.

Chemische Struktur von Nucleinsäuren

In den nun folgenden Betrachtungen werden die in der Molekularbiologie und der genetischen Forschung häufig verwendeten Organismen ausführlich vorgestellt. Jeder dieser Organismen besitzt Gene aus DNA, die sich untersuchen und verändern lassen. Eine Erörterung der Grundstruktur der DNA ist daher für das Verständnis essenziell. Die in der DNA enthaltene genetische Information und die Mechanismen ihrer Expression sind bei jedem Organismus auf der Erde gleich und bestimmen unsere Identität.

Zu den Nucleinsäuren zählen zwei verwandte Moleküle, Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Ribonucleinsäure (RNA). DNA und RNA sind Polymere aus monomeren Untereinheiten, die als **Nucleotide** bezeichnet werden und deren Reihenfolge die Information der Nucleinsäure enthält. Nucleotide bestehen aus drei Komponenten: einer **Phosphatgruppe**, einem Zucker aus fünf Kohlenstoffatomen und einer stickstoffhaltigen **Base** (Abb. 1.3). Der C₅-Zucker, die **Pentose**, ist bei DNA und RNA unterschiedlich. DNA besitzt eine **Desoxyribose**, während RNA eine **Ribose** enthält. Diese beiden Zucker unterscheiden sich nur in einer Hydroxylgruppe; Ribose trägt an der 2'-Position eine Hydroxylgruppe, die der Desoxyribose fehlt. An diese Zucker können fünf verschiedene Basen gebunden sein. Bei der DNA sind es Guanin, Cytosin, Adenin oder Thymin. Bei der RNA ist Thymin durch Uracil ersetzt (s. Abb. 1.3).

Jedes Phosphat verknüpft zwei Zuckermoleküle über eine **Phosphodiesterbindung**. Diese verbindet die einzelnen Nucleotide zu einer langen Kette mit unterschiedlichen Enden (5' und 3'). Dabei wird die 5'-OH-Gruppe am Zucker eines Nucleotids über das Sauerstoffatom mit der Phosphatgruppe verknüpft. Die 3'-OH-Gruppe des Zuckers des folgenden Nucleotids ist ebenfalls mit dem Phosphat verbunden.

Die Basen der Nucleinsäuren ragen aus dem Zucker-Phosphat-Rückgrat heraus und sind frei, um an andere Moleküle zu binden. Die Struktur der DNA ist am stabilsten, wenn sich zwei Einzelstränge aus Nucleotiden zusammenlagern, sodass ein doppelsträngiges Molekül entsteht – wie es bei der DNA-**Doppelhelix** der Fall ist. Jede Base bildet dabei mit einer Base des anderen Stranges Wasserstoffbrücken aus. Die beiden Stränge liegen **antiparallel**, d.h. sie verlaufen in entgegengesetzter Orientierung, wobei das 5'-Ende des ersten Stranges dem 3'-Ende des zweiten Stranges gegenüber liegt und umgekehrt.

Die Basen sind entweder **Purine** (Guanin und Adenin) oder **Pyrimidine** (Cytosin und Thymin). Jedes Basenpaar besteht aus einem Purin, das über Wasserstoffbrücken mit einem Pyrimidin verknüpft ist. Guanin paart nur mit Cytosin (G–C) und zwar über drei Wasserstoffbrücken, Adenin paart in der DNA mit Thymin (A–T) oder in der RNA mit Uracil (A–U). Da Adenin und Thymin (A–T) bzw. Adenin und Uracil (A–U) nur durch zwei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, ist weniger Energie als bei einem G–C-Paar erforderlich, um die Verbindung zwischen diesen beiden Basen zu spalten.

Die doppelsträngige DNA nimmt die dreidimensionale Gestalt mit der geringsten potenziellen Energie an. Die stabilste Form ist eine doppelsträngige Helix. Diese Helix windet sich im Uhrzeigersinn um eine zentrale Achse und wird als **rechtsgängige Helix** bezeichnet. Eine vollständige Windung hat eine Länge von 3,4 nm und umfasst etwa 10 Basenpaare (bp). Die DNA ist nicht statisch, sondern vermag ihre Konformation als Reaktion auf verschiedene Umgebungsbedingungen zu verändern. Die gerade beschriebene typische Konformation wird als **B-Form** bezeichnet und herrscht in wässrigem Milieu mit niedrigen Salzkonzentrationen vor. Wird die DNA in eine Umgebung mit hoher Salzkonzentration überführt, verändert sie sich zur **A-Form**, bei der es eher 11 bp pro Windung sind. Eine weitere Konformation ist die **Z-Form**, deren Helix linksgängig ist und die 12 bp pro Windung aufweist. In dieser Form nimmt das Phosphatrückgrat eine Zickzackform ein. Diese beiden Konformationen sind möglicherweise unter bestimmten Bedingungen biologisch bedeutend.

DNA und RNA sind Strukturen aus sich einander abwechselnden Phosphat- und Zuckerresten, die zu einem Rückgrat verbunden sind. An den Zuckern sind Basen gebunden, welche aus dem Rückgrat ragen. Diese Basen können mit den Basen eines anderen Stranges Paarungen eingehen, sodass sich eine doppelsträngige Helix bildet.

Verpackung von Nucleinsäuren

Bakterien besitzen nur einige Tausend Gene, von denen jedes etwa 1000 Nucleotide lang ist. Diese Gene sind auf einem Chromosom lokalisiert, das in

Exkurs 1.1

Gregor Johann Mendel (1822–1884): Der Begründer der modernen Genetik

Als junger Mann erforschte Mendel die Genetik, und er unterrichtete Kinder einer Oberschule in Brünn (im heutigen Tschechien) in Mathematik, Physik und Griechisch. Mendel wählte für seine Untersuchungen zur Vererbung von unterschiedlichen Merkmalen die Gartenerbse (*Pisum sativum*) aus, weil sich von ihr pro Jahr zwei Pflanzengenerationen anziehen lassen. Er analysierte verschiedene physische Merkmale wie Blütenfarbe, Blütenposition sowie Farbe und Form von Samen (Erbsen) und Hülsen. Mendel zog zunächst Pflanzen mit unterschiedlichen Merkmalen dicht nebeneinander an und suchte nach Merkmalen, die sich vermischten. Glücklicherweise beruhten die von ihm analysierten Eigenschaften jeweils auf nur einem Gen, das entweder dominant oder rezessiv war, was ihm zu dieser Zeit allerdings nicht bewusst war. Er beobachtete, dass eine „Mischung“ der Merkmalsformen (die Ausprägung eines Merkmals) niemals eintrat. Säte er z.B. gelbe Samen neben grünen, dann entsprachen die Nachkommen exakt ihren Eltern. Dies bewies, dass sich die Merkmalsformen der Eltern bei den Nachkommen nicht mischten, wie es zu dieser Zeit allgemein angenommen wurde.

Als nächstes übertrug Mendel Pollen von einer Pflanze auf eine andere mit anderen Merkmalsformen. Er bestimmte die Anzahl der Nachkommen, die jeweils eine bestimmte Form geerbt hatten und fand heraus, dass sie in einem bestimmten Verhältnis zueinander vererbt wurden. Kreuzte er z.B. Pflanzen mit gelben Samen und solche mit grünen, dann waren die Samen der Nachkommen, der F₁-Generation, alle gelb. Daher musste die Merkmalsform „gelb“ dominant über „grün“ sein oder diese maskieren. Nun säte er die F₁-Generation und ließ sie Nachkommen produzieren. Von der entstandenen F₂-Generation waren $\frac{3}{4}$ der Samen gelb und $\frac{1}{4}$ grün. Aus der Beobachtung, dass die grünen Samen nach einer übersprungenen Generation wieder auftauchten, schloss Mendel, dass in einem Elter ein Faktor für die grüne Farbe vorhanden gewesen sein musste – heute bezeichnen wir diesen Faktor als Gen – auch wenn sich diese Merkmalsform nicht ausgeprägt hatte.

Mendel enthüllte viele Prinzipien, von denen einige später als Mendelsche Regeln formuliert wurden. Diese Regeln bilden die Grundlage der modernen Genetik. Die **Aufspaltungsregel** (Segregation) besagt, dass für jede Merkmalsform an die nachfolgende Generation Einheiten oder Faktoren (heute als Gene bezeichnet) vererbt werden. Jeder Elter besitzt von jedem Gen zwei Kopien, gibt aber nur eine Kopie an jeden Nachkommen weiter. Die **Unabhängigkeitsregel** besagt, dass verschiedene Nachkommen derselben Eltern unterschiedliche Sätze von Genen erhalten können. Derselbe Phänotyp (die beobachtbare physische Erscheinungsform) kann auf verschiedenen Genotypen (Ausstattung an Genen) beruhen. Mit anderen Worten: Obwohl ein Gen vorhanden ist, muss die Merkmalsform nicht in jeder Generation sichtbar sein. Zu Beginn seiner Versuche verwendete Mendel homozygote (reinerbige) Erbsenpflanzen – das bedeutet, dass die beobachtete Merkmalsform für viele Generationen die einzig auftretende Form war. Als er das erste Mal eine Pflanze mit gelben Samen mit einer Pflanze kreuzte, die grüne Samen hervorbrachte, trug jeder dieser Eltern zwei identische Kopien oder **Allele** des entsprechenden Gens; die Elternpflanzen mit grünen Samen hatten zwei Allele für grüne Erbsen und die Elternpflanzen mit gelben Samen zwei Allele für gelbe. Somit erhielt jedes Individuum der F₁-Generation von den Eltern ein Allel für gelbe und ein Allel für grüne Samenfarbe. Die Samen hatten aber unabhängig davon alle einen gelben Phänotyp. Die Samenfarbe „Gelb“ ist daher dominant über „Grün“. Anschließend säte Mendel die F₁-Samen aus und ließ die Blüten sich selbst bestäuben. Von den F₂-Samen trugen einige zwei rezessive Allele für die grüne Farbe und hatten dementsprechend einen grünen Phänotyp (Abb.).

Mendel veröffentlichte seine Ergebnisse, doch bis nach seinem Tod erkannte niemand die Bedeutung seiner Forschung. In den späteren Jahren seines Lebens wurde Mendel Mönch in einem Kloster und verfolgte seine Studien zur Genetik nicht weiter.

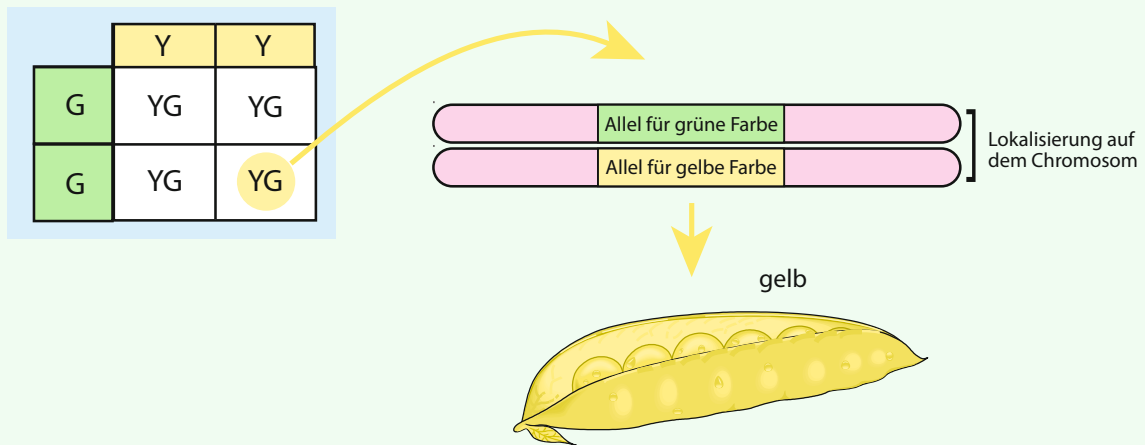
der Zelle ein einzelnes großes ringförmiges DNA-Molekül bildet. Eine DNA-Doppelhelix mit dieser Anzahl an Genen ist jedoch um den Faktor 1000 zu lang, um in eine Bakterienzelle zu passen. Die Helix muss daher in irgendeiner Form kondensiert sein, um nur wenig Platz zu beanspruchen.

In Bakterien wird die DNA durch eine **Superspiralisierung** kondensiert. Diese Superspiralisierung wird durch das Enzym **DNA-Gyrase** kataly-

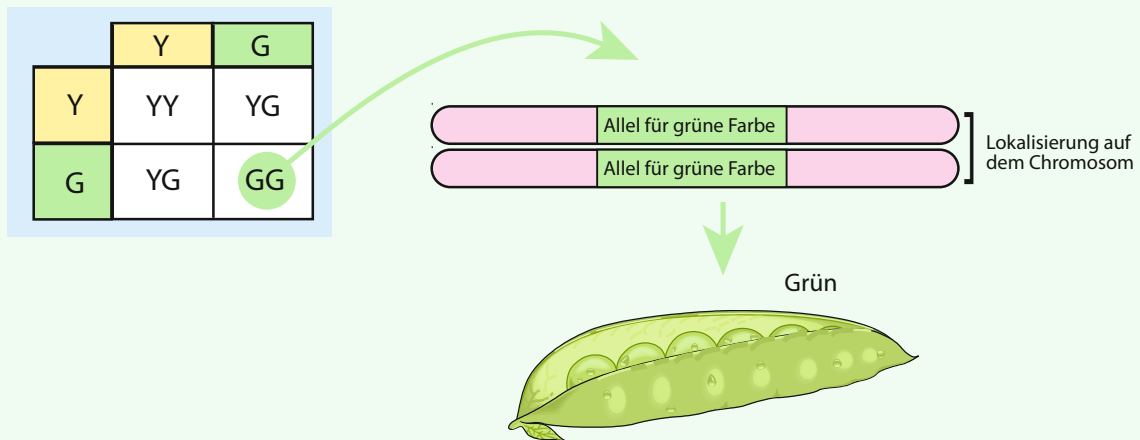
siert, das die DNA in einer linksgängigen Windung so verdreht, dass eine Superspirale aus etwa 200 Nucleotiden entsteht. Durch die Verdrehung wird die DNA kondensiert. Überschüssige Spiralisierungen werden durch **Topoisomerase I** entfernt. Die superspiralisierte DNA bildet Schleifen aus, die mit einem Proteingerüst verbunden sind (s. Abb. 1.4).

Beim Menschen und in Pflanzen muss dagegen viel mehr DNA verpackt werden. Die Superspira-

a F_1 : gelbe Samen \times grüne Samen



b F_2 : Selbstbestäubung einer Heterozygoten



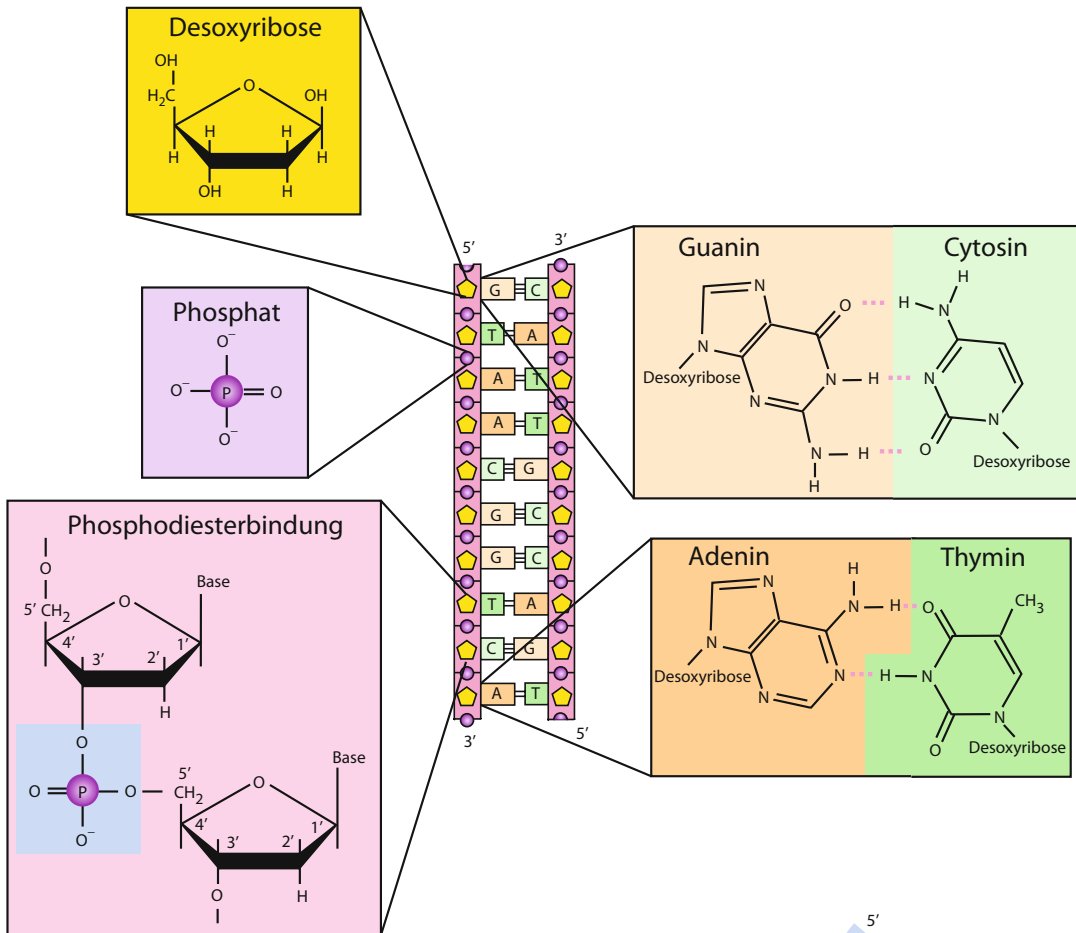
Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp

a Jeder Elter besitzt zwei Allele, entweder zwei für gelbe Samen oder zwei für grüne. Jeder Nachkomme ist heterozygot, d.h., er besitzt ein Allel für die gelbe Farbe und eines für die grüne. Da das gelbe Allel dominant ist, sind die Samen alle gelb. **b** Bestäubt sich die F_1 -Pflanze selbst, dann erscheint bei $\frac{1}{4}$ der F_2 -Generation wieder der grüne Phänotyp.

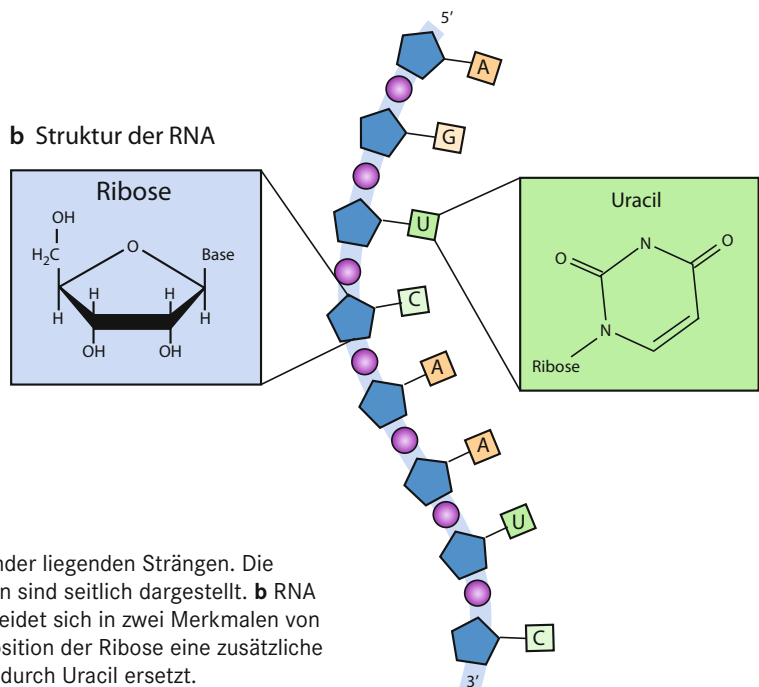
lisierung reicht hier nicht aus. Eukaryotische DNA ist um positiv geladene Proteine gewunden, die als **Histone** bezeichnet werden und die die negative Ladung des Phosphatrückgrates aufheben. Die sich bildende Struktur erinnert an eine Perlenkette, und man bezeichnet sie als **Chromatin**. Jede „Perle“, oder **Nucleosom**, besteht aus ungefähr 200 bp und neun Histonproteinen, zwei H2A, zwei H2B, zwei H3, zwei H4 und ein H1. An der Bildung eines Nucleosoms

sind alle Histonproteine beteiligt außer H1. H1 lagert sich an die Nucleosomen und bindet die DNA der Linker-Region, wodurch sich die Nucleosomen einander annähern. Die Histonproteine sind stark konserviert und kommen in allen Eukaryoten vor – und sogar in vereinfachter Form bei Archaeobakterien. Die Enden der Histonproteine ragen aus dem Nucleosom und sind für die Regulation von Bedeutung. In exprimierten DNA-Regionen sind die Histone locker

a Struktur der DNA

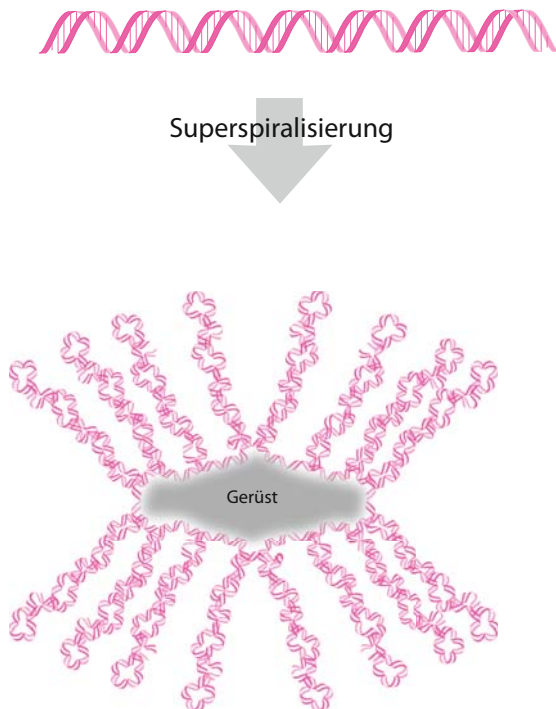
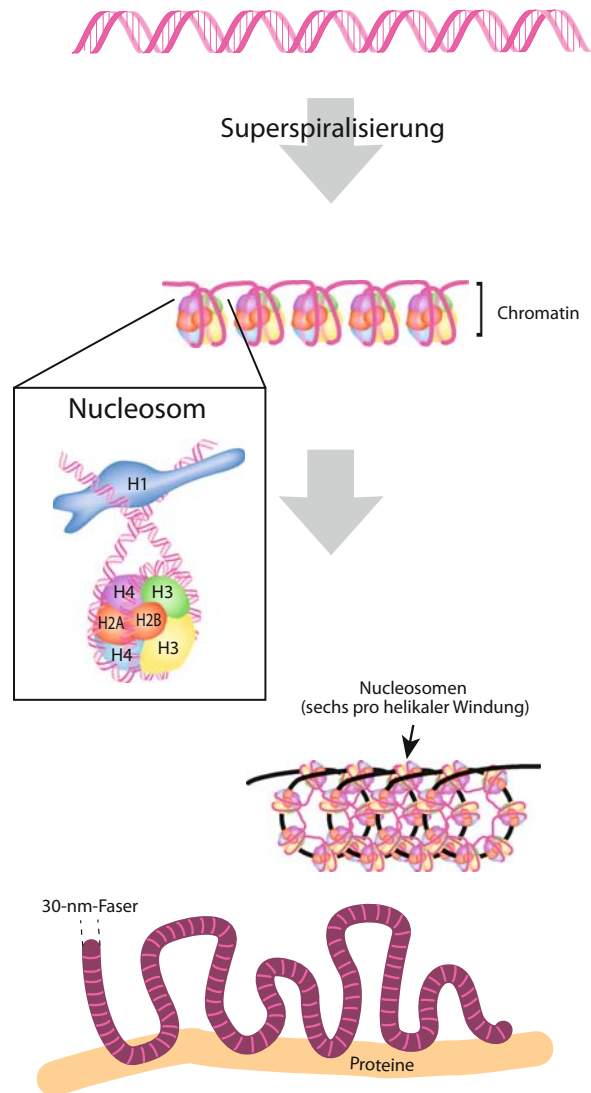


b Struktur der RNA



1.3 Struktur von Nucleinsäuren

a DNA besteht aus zwei antiparallel zueinander liegenden Strängen. Die Strukturen der einzelnen DNA-Komponenten sind seitlich dargestellt. **b** RNA ist in der Regel einzelsträngig und unterscheidet sich in zwei Merkmalen von der DNA. Erstens befindet sich an der 2'-Position der Ribose eine zusätzliche Hydroxyl-(OH)-Gruppe, zweitens ist Thymin durch Uracil ersetzt.

a Prokaryot**b Eukaryot****1.4 Verpackung der DNA in Bakterien und Eukaryoten**

a In Bakterien ist die DNA superspiralisiert und an ein Proteingerüst geheftet. So wird diese verdichtet und das Molekül passt in die Zelle. **b** Eukaryotische DNA ist um Histone gewunden und es bilden sich Nucleosomen. Nucleosomen sind weiter zur 30-nm-Faser kondensiert, die über Proteine an sogenannte MARs gebunden ist.

angeordnet, wodurch die DNA für regulatorische Proteine und Enzyme zugänglich wird. In nichtexprimierten Bereichen liegen die Histone dicht beieinander und verhindern so den Zutritt anderer Proteine zur DNA (diese Struktur wird als **Heterochromatin** bezeichnet).

Chromatin ist jedoch nicht ausreichend verdichtet, um das gesamte eukaryotische Genom für den Zellkern aufzunehmen. Es wird weiter zu einer helikalen Struktur verdreht, die man als **30-nm-Faser** bezeichnet und die pro Windung etwa sechs Nucleosomen umfasst. Diese Faser bildet Schleifen, de-

ren Umkehrpunkte mit einem Proteingerüst oder der Chromosomenachse verbunden sind. Die Kontaktstellen sind auf spezifische Regionen, die **Matrixanheftungsregionen** (engl. *matrix attachment regions*, **MAR**), begrenzt. Der Kontakt wird durch **MAR-Proteine** vermittelt. Diese Stellen haben eine Länge von 200–1000 Basenpaaren und einen A/T-Gehalt von 70 %. A/T-reiche DNA ist leicht gebogen, sodass die Verbindung zwischen den Proteinen der Matrix und der DNA unterstützt wird. Häufig befinden sich in diesen Bereichen Enhancer und regulatorische Elemente, was darauf hinweist, dass die Konformation an

diesen Stellen die Bindung von Aktivatoren und Repressoren unterstützt. Die eben beschriebene Struktur bezeichnet man als **Chromosom**. Während des normalen Zellwachstums ist die DNA in dieser Form organisiert. Ein eukaryotisches Chromosom vor der Mitose und Zellteilung ist noch weiter kondensiert. Wie diese Verdichtung abläuft ist bislang ungeklärt.

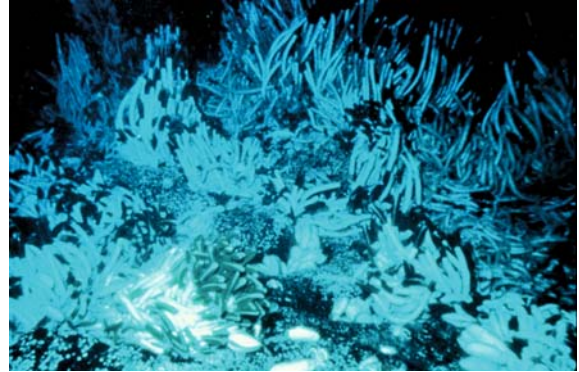
Durch Superspiralisierung und Windung der DNA um Histone entsteht Chromatin, das schließlich an ein Proteingerüst geheftet wird, um im Zellkern Platz zu finden.

Bakterien als Arbeitspferde der Biotechnologie

DNA ist der Faden des Lebens. Sie kommt in jedem lebenden Organismus auf der Erde vor (und sogar in manchen Einheiten, die als nichtlebendig erachtet werden – siehe unten), von denen jedoch nur ein winziger Bruchteil bisher unter molekularbiologischen Gesichtspunkten untersucht wurde. Diese wenigen Organismen haben meist spezielle Eigenschaften und können leicht kultiviert, untersucht oder gentechnisch verändert werden. Diese sogenannten Modellorganismen dienen dem besseren Verständnis anderer verwandter, nicht so ausführlich untersuchter Organismen. Sie kommen zudem bei einer Vielzahl von praxisnahen, biotechnologischen Fragestellungen zum Einsatz.

Bakterien leben überall auf unserem Planeten und nehmen im Ökosystem einen sehr wichtigen Platz ein. Auf der Erde gibt es schätzungsweise 5×10^{30} Bakterien, von denen ungefähr 90 % im Boden und unterhalb der Meeresoberfläche leben. Ist diese Schätzung korrekt, dann ist etwa 50 % der lebenden Materie mikrobiologischen Ursprungs. Bakterien wurden in jeder ökologischen Nische gefunden. Einige Bakterien leben in Eisseen der Antarktis, die nur wenige Monate im Jahr tauen. Andere existieren unter extrem heißen Bedingungen, beispielsweise in heißen Schwefelquellen oder Hydrothermalquellen am Boden des Ozeans (Abb. 1.5). Aufgrund ihrer physiologischen Unterschiede besteht ein großes Interesse an diesen Mikroorganismen.

So vermag *Thermus aquaticus*, ein Bakterium aus heißen Quellen, bei Temperaturen nahe dem Siedepunkt und einem pH-Wert von ungefähr 1 zu über-



1.5 Röhrenwürmer in Hydrothermalquellen

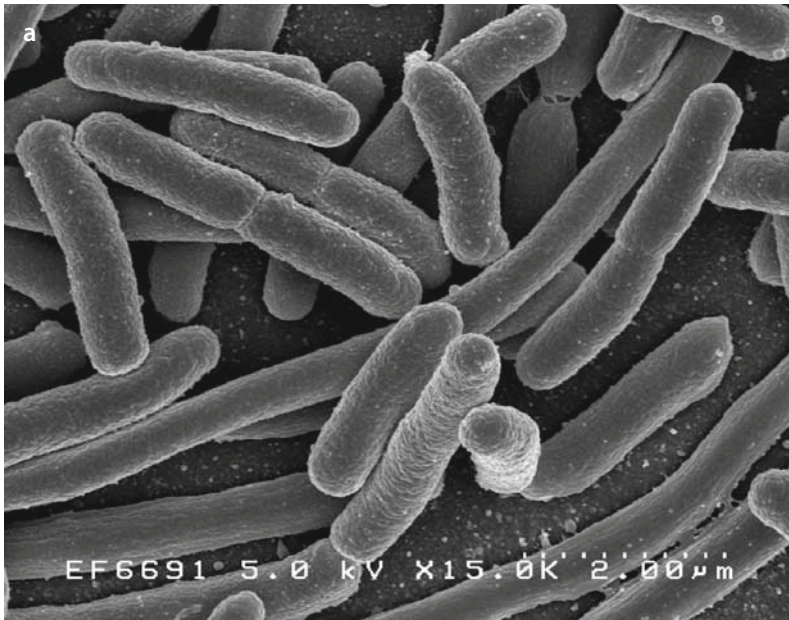
Diese Röhrenwürmer in Hydrothermalquellen am Boden des Pazifiks gewinnen Energie aus einer Symbiose mit Bakterien, die in ihnen leben. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom National Oceanic & Atmospheric Administration/National Undersea Research Program (NURP).

leben. Wie andere Organismen auch repliziert dieses Bakterium seine DNA mithilfe des Enzyms **DNA-Polymerase**. Der Unterschied ist allerdings, dass die DNA-Polymerase aus *T. aquaticus* auch bei hohen Temperaturen aktiv sein muss, sie ist **thermostabil**. Molekularbiologen nutzen dieses Enzym für Verfahren wie die **Polymerasekettenreaktion** oder **PCR** (s. Kap. 4), die bei hohen Temperaturen durchgeführt wird. Auch andere Bakterien extremer Standorte besitzen interessante Proteine und Enzyme, die in neuen Verfahren eingesetzt werden könnten. Hydrothermalquellen am Boden des Ozeans offenbaren eine faszinierende Vielfalt an unbekannten Organismen (s. Abb. 1.5). Die Wassertemperaturen in unterschiedlichen Quellen variieren zwischen 25 °C und 450 °C.

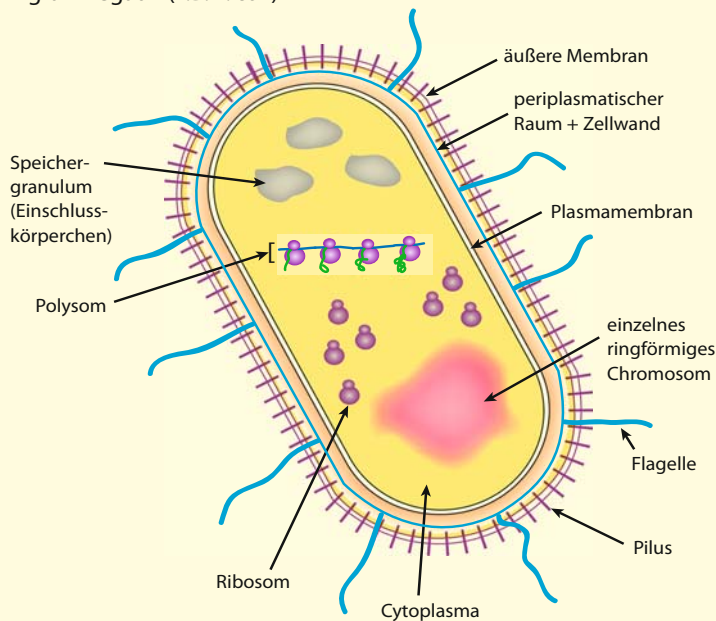
Bakterien haben sich im Verlauf der Evolution an jede ökologische Nische auf der Erde angepasst und stellen der Forschung viele einzigartige Eigenschaften zur Verfügung.

Escherichia coli als Modellbakterium

Obwohl unter extremen Bedingungen lebende Bakterien interessant und nützlich sind, sind die gewöhnlicheren Bakterien die Arbeitspferde im Laboralltag der molekularbiologischen und biotechnologischen



b gramnegativ (z.B. *E. coli*)



1.6 Subzelluläre Struktur von *Escherichia coli*

a Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli*. Die stäbchenförmigen Bakterien sind etwa $0,6\ \mu\text{m}$ breit und $1\text{--}2\ \mu\text{m}$ lang. Mit freundlicher Genehmigung der Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH. **b** Das Cytoplasma von gramnegativen Bakterien ist von einer Hülle aus drei Schichten umgeben. Die äußere Membran besteht aus einer Lipiddoppelschicht und die Zellwand ist aus Peptidoglykan aufgebaut. Im Gegensatz zu Eukaryoten ist das Chromosom nicht von einer Membran umgeben, sondern die DNA liegt frei zugänglich im Cytoplasma.

Forschung. Am häufigsten wird *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet, ein stäbchenförmiges Bakterium mit einer Länge von $1\text{--}2,5\ \mu\text{m}$. *E. coli* lebt normalerweise im Darm von Säugetieren, einschließlich des Menschen (Abb. 1.6). Es handelt sich um ein gramnegatives Bakterium mit einer äußeren Membran, einer dünnen Zellwand und einer Plasmamembran,

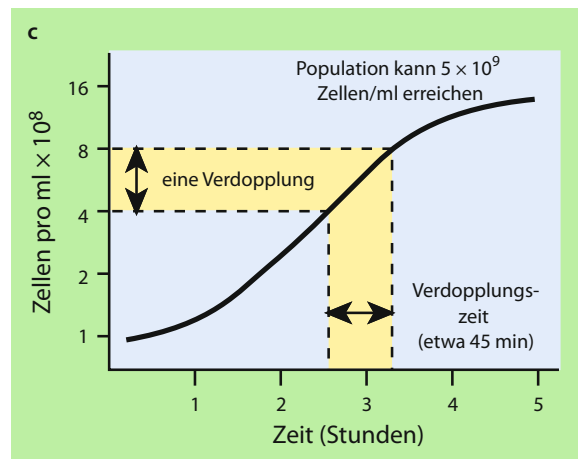
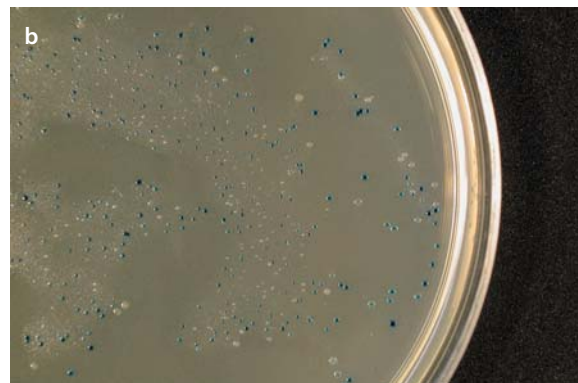
die die Zellkomponenten umschließt. Wie alle Prokaryoten besitzt *E. coli* keinen Zellkern und keine Kernhülle, sein Chromosom liegt frei im Cytoplasma. Die äußere Oberfläche des Bakteriums ist mit etwa 10 Flagellen besetzt, die die Zelle vorwärts treiben, sie trägt außerdem Tausende von Pili, mit deren Hilfe sich die Zelle an Oberflächen heftet.

Obwohl die Medien gelegentlich davon berichten, dass Nahrungsmittel mit *E. coli* kontaminiert sind, ist *E. coli* in der Regel harmlos. Jedoch sind manche Stämme des Bakteriums pathogen und sekretieren Toxine, die durch Schädigung der Darmwand Diarrhö verursachen. Dadurch wird Flüssigkeit nicht aus dem Darm aufgenommen, sondern in den Darm freigesetzt. *E. coli* O157:H7 ist ein besonders pathogener Stamm. Er trägt zwei Toxingene, die blutigen Durchfall hervorrufen. Besonders gefährlich ist der Stamm für Kinder, Alte und Menschen mit einem geschwächten Immunsystem.

Bakterien sind in vielerlei Hinsicht für die Forschung vorteilhaft. Sie haben günstige Wachstumseigenschaften, was nützlich ist, wenn eine große Zahl identischer Zellen benötigt wird. Eine Bakterienkultur lässt sich innerhalb von ein paar Stunden anziehen und enthält bis zu 10^9 Bakterienzellen pro Milliliter. Das Wachstum lässt sich genau über die Menge und Art der Nährstoffe, die Temperatur und die Wachstumszeit einstellen. *E. coli* ist leicht zu kultivieren, da das Bakterium in Flüssigkultur oder auf einem festen Medium wie Agar wächst. Das Medium besteht aus einer Mischung aus Mineralsalzen, Wasser und einer Zuckerquelle (Abb. 1.7). Flüssigkulturen lassen sich im Kühlschrank über Wochen lagern, ohne dass die Bakterien Schaden nehmen. Außerdem können die Bakterien für 20 Jahre oder länger bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden, sodass ein Vorrat an verschiedenen Stämmen gehalten werden kann, ohne diese Stämme laufend kultivieren zu müssen. *E. coli* wird in der Regel an atmosphärischer Luft kultiviert. Das Bakterium vermag jedoch auch anaerob zu wachsen, wenn das Experiment den Ausschluss von Sauerstoff erfordert.

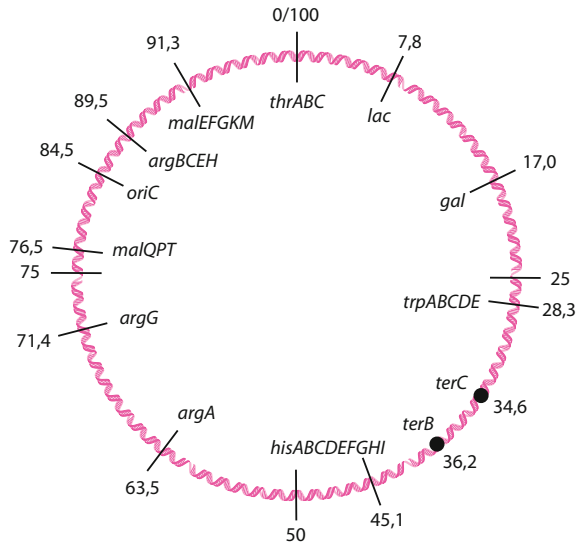
Bakterien sind einzellige Organismen. Die Zellen in einer Bakterienkultur sind alle identisch. Im Gegensatz dazu besteht bei Säugern ein einzelnes Gewebe aus vielen verschiedenen Zelltypen. Jede *E. coli*-Zelle besitzt ein ringförmiges Chromosom mit 4000 Genen, die in je einer Kopie vorliegen. Die Zahl der Gene ist sehr viel geringer als beim Menschen, der von jedem seiner etwa 25000 Gene zwei Kopien besitzt – verteilt auf 46 Chromosomen. Genetische Analysen sind daher in Bakterien viel einfacher durchzuführen (Abb. 1.8).

Escherichia coli ist der bakterielle Modellorganismus, der in der molekularbiologischen und biotechnologischen Grundlagenforschung verwendet wird. Das Bakterium besitzt eine einfache Struktur, ist im Labor leicht zu kultivieren und enthält nur sehr wenige Gene.



1.7 Bakterien sind leicht zu kultivieren

a Bakterien, die in einer Flüssigkultur wachsen. **b** Bakterien, die auf Agar wachsen. Diese Aufnahme zeigt verschiedene Bakterienkolonien, die mit dem Verfahren der Blau/Weiß-Selektion auf die Anwesenheit einer Insertion in einem Plasmid getestet wurden. Ausführlichere Information in Kapitel 3 und in Abbildung 3.15. **c** Die Zahl schnell wachsender Bakterien kann sich in kurzer Zeit verdoppeln. In diesem Beispiel verdoppelt sich die Zahl der Bakterien in etwa 45 min und erreicht innerhalb von ungefähr fünf Stunden eine Dichte von 5×10^9 Zellen/ml.

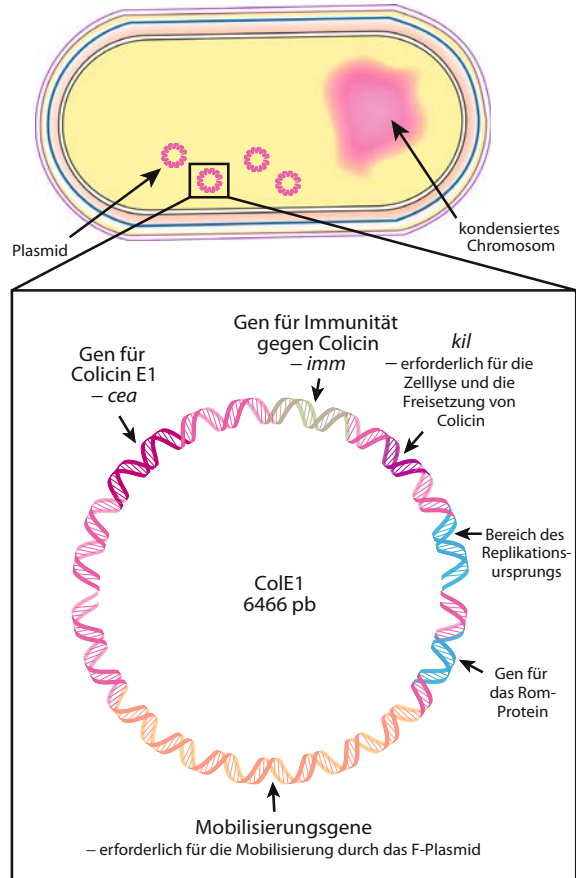


1.8 Chromosom von *E. coli*

Das *E. coli*-Chromosom wird in 100 Karteneinheiten eingeteilt, die zufällig beim *thrABC*-Operon beginnen. Dargestellt sind verschiedene Gene und ihre Position. Der Replikationsursprung (*oriC*) und der Bereich der Termination (*terB* und *terC*) sind eingezeichnet.

Viele Bakterien enthalten Plasmide

Die vielen unterschiedlichen Bakterienformen, die in jeder natürlichen Umgebung vorkommen, konkurrieren in der Regel um Nährstoffe und Lebensraum. Viele Bakterien betreiben eine Art biologischer Kriegsführung und sekretieren Toxine, die man unter dem Sammelbegriff **Bacteriocine** zusammenfasst. Sie töten Bakterien in der nahen Umgebung ab. Beispielsweise wirkt Nisin, ein Bacteriocin aus *Lactococcus lactis*, tödlich auf andere in Lebensmitteln vorkommende Krankheitserreger wie *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus*. Auch *E. coli* produziert Bacteriocine, die **Colicine**, zu denen verschiedene Verbindungen wie Colicin E1 oder Colicin M gehören, die Zellen in der Umgebung abtöten. Colicine wirken hauptsächlich über zwei Mechanismen: Einige rufen Löcher in der Zellmembran hervor. Dadurch strömen lebenswichtige Ionen aus, und die protonenmotorische Kraft, die die Synthese von ATP antreibt, wird zerstört. Andere sind DNA- und RNA-abbauende Nucleasen. Die Toxine beeinträchtigen die Zellen, die sie produzieren nicht, weil von diesen Zellen ein



1.9 Plasmide enthalten die Gene für Colicin

ColE1-Plasmide sind extrachromosomale DNA-Elemente in Bakterien, die ein Toxin produzieren (*cea*-Gen). Die Plasmide tragen ebenfalls Gene für die Freisetzung des Toxins und Immunität. Sie wurden verändert, damit sie Gene aufnehmen können, die für die Gentechnik von Bedeutung sind.

Immunitätsprotein synthetisiert wird, welches das Toxin erkennt und neutralisiert.

Das Vermögen, Colicin produzieren zu können, beruht auf der Anwesenheit eines extrachromosomalen genetischen Elements, das als **Plasmid** bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um einen kleinen DNA-Ring, der im Cytoplasma von Bakterien und einigen Eukaryoten wie Hefe vorkommt. Ein Plasmid, auf dem die Colicinproduktion codiert ist, trägt eine Vielzahl von Genen: das Gen für das Colicin, das Gen für das Immunitätsprotein und Gene, die die Replikation des Plasmids und die Anzahl der Kopien kontrollieren. Zusätzlich besitzen alle Plasmide einen **Replikationsursprung**. Teilt sich die Wirtszelle, dann teilen sich auch die Plasmide (Abb. 1.9). Die

Colicinplasmide werden in der Molekularbiologie häufig eingesetzt. Die Gene für die Colicinsynthese wurden in diesen Plasmiden entfernt und die übrigen Teile so stark verändert, dass sich in den Bakterien andere Gene effizient exprimieren lassen. Die so hergestellten **rekombinanten Plasmide** sind der Schlüssel zur gesamten Molekularbiologie. Alle heutigen Fortschritte in der Biotechnologie haben ihren Ursprung in der Möglichkeit, **heterologe** Proteine in Bakterien zu exprimieren (zu Klonierungsvektoren siehe Kapitel 3).

Ein weiteres wichtiges Merkmal von *E. coli* ist die Anwesenheit von extrachromosomalen Elementen, die man als Plasmide bezeichnet. Diese kleinen DNA-Ringe lassen sich leicht aus Bakterien extrahieren, durch Hinzufügen oder Modifizieren von Genen verändern und in eine andere Bakterienzelle einschleusen, in der die neuen Gene exprimiert werden.

Andere Bakterien in der Biotechnologie

Für die biotechnologische Herstellung von Produkten werden neben *E. coli* auch andere Bakterien eingesetzt. *Bacillus subtilis* ist ein grampositives Bakterium, mit dessen Hilfe sich Biologie und Genetik von grampositiven Bakterien erforschen lassen. *Bacillus* kann Dauersporen bilden, die nahezu unbegrenzt lagerfähig sind. Das Bakterium wird außerdem in der Biotechnologie eingesetzt. Für die industrielle Herstellung von Produkten ist die Sekretion von Proteinen durch die einzelne Membran der grampositiven Bakterien viel einfacher als es bei gramnegativen Bakterien mit ihrer doppelten Membran möglich ist; daher werden *Bacillus*-Stämme für die Synthese von extrazellulären Enzymen wie Proteasen und Amylasen in großem Maßstab verwendet.

Pseudomonas putida ist ein Bakterium, das normalerweise im Wasser lebt. Wie *E. coli* ist das Bakterium gramnegativ, doch kommt es in der Regel bei Umweltanalysen zu Einsatz, da es viele aromatische Verbindung abzubauen vermag (s. Kap. 13). *Streptomyces coelicolor* ist ein grampositives Bodenbakterium. Es baut Cellulose und Chitin ab und synthetisiert viele unterschiedliche Antibiotika. Ein weiterer, häufig industriell eingesetzter Mikroorganismus ist

Corynebacterium glutamicum. Er dient der biotechnologischen Herstellung von L-Glutaminsäure und L-Lysin.

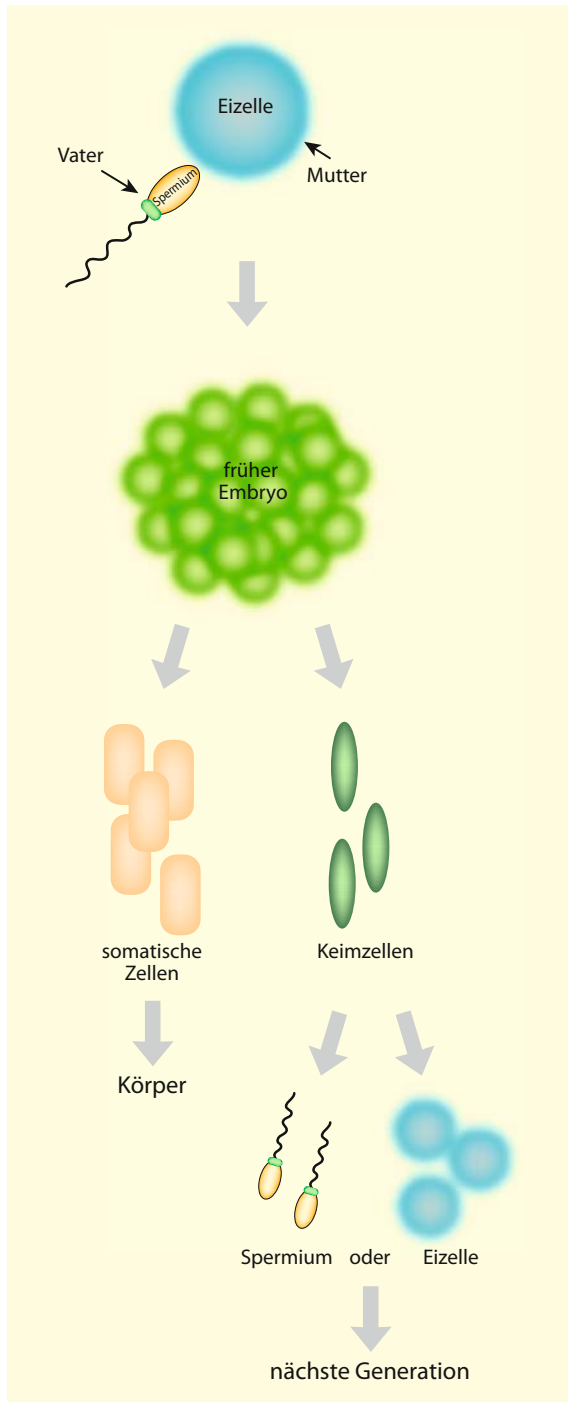
Aufgrund ihrer einzigartigen Fähigkeiten werden in der biotechnologischen Forschung viele verschiedene Bakterien eingesetzt.

Grundlagen der Genetik eukaryotischer Zellen

Die meisten Eukaryoten sind **diploid**, d.h., sie besitzen von jedem Chromosom zwei homologe Kopien. Dieses trifft auf den Menschen zu wie auch auf Mäuse, Zebrafische, *Drosophila*, *Arabidopsis*, *C. elegans* und die meisten anderen Eukaryoten. Mehr als zwei Kopien des Genoms zu besitzen ist bei Tieren äußerst selten, und man hat bislang nur bei einer argentinischen Ratte vier Genomkopien entdeckt. Dagegen sind viele Pflanzen und insbesondere Kulturpflanzen **polyploid**, sie besitzen vielfache Kopien ihres Genoms. So hatte beispielsweise der Vorfahr des Weizens sieben Chromosomenpaare (d.h. $2n = 14$), der heutige Weizen verfügt jedoch über 42 Chromosomen und ist somit hexaploid. Auch in kultivierten Sorten von Hafer, Erdnuss, Zuckerrohr, Kartoffel, Tabak und Baumwolle liegen vier bis sechs Genomkopien vor. Diese Tatsache macht die genetische Analyse sehr kompliziert.

Bei Tieren unterscheidet man zwischen **Keimbahnzellen** und **somatischen Zellen**. Zellen der Keimbahn sind die einzigen, deren Teilung zu haploiden Abkömmlingen führen. Aus diploiden Zellen der Keimbahn entstehen haploide Gameten – die Eizellen und die Spermien, die zur Vermehrung des Individuums beitragen. Bei der Befruchtung fusionieren die beiden haploiden Zellen und es entsteht eine diploide Zelle – die Zygote. Somatische Zellen sind dagegen in der Regel diploid und formen das Individuum. Alle Mutationen in somatischen Zellen werden ausgelöscht, wenn der Organismus stirbt, eine Mutation in einer Keimbahnzelle wird jedoch an die nächste Generation vererbt (Abb. 1.10).

Mutiert eine somatische Zelle früh in ihrer Entwicklung, dann tragen alle von ihr abstammenden somatischen Zellen den Defekt. Angenommen, die ursprüngliche Zelle ist der Vorläufer des linken Auges und der Defekt verhindert die Bildung des braun-



1.10 Somatische Zellen versus Keimbahnzellen

Während der Entwicklung werden Zellen entweder zu somatischen Zellen, aus denen der Körper besteht, oder zu Keimbahnzellen, aus denen entweder Eizellen oder Spermien entstehen. Die Keimbahnzellen sind die einzigen Zellen, deren Gene an die nächsten Generationen weitergegeben werden.

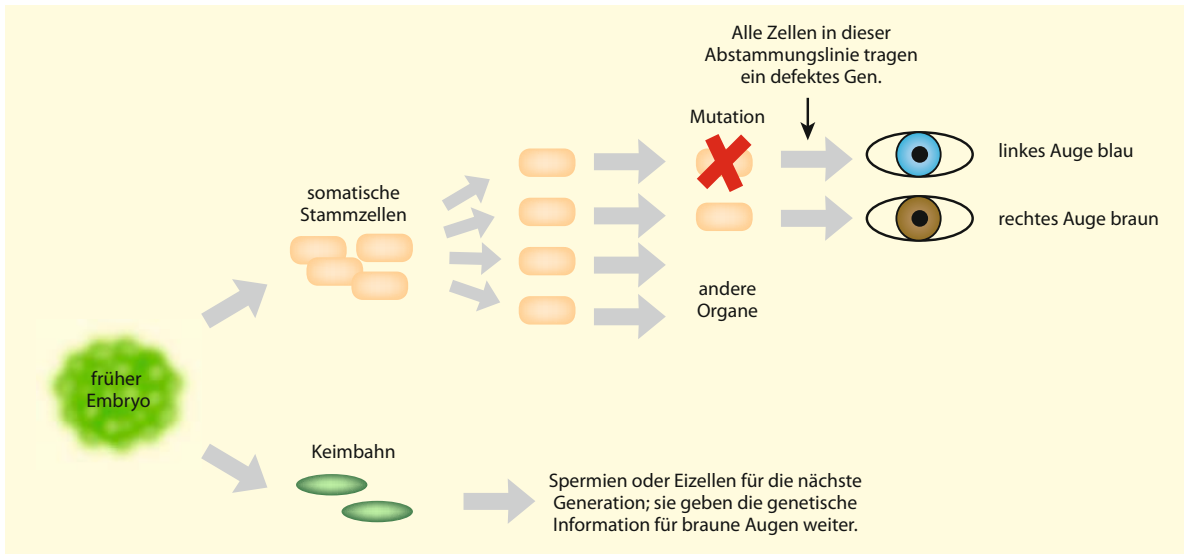
nen Pigments, das braunen Augen ihre Farbe verleiht. Das rechte Auge wird braun sein, das mutierte linke Auge hingegen blau (Abb. 1.11). Blaue Augen beruhen nicht auf einem blauen Pigment, ihnen fehlt nur das braune. Solche Ereignisse bezeichnet man als **somatische Mutationen**. Sie werden nicht an die Nachkommen vererbt. Dennoch können Mutationen in somatischen Zellen schwerwiegende Folgen haben; sie sind die Ursache für die meisten Formen von Krebserkrankungen (s. Kap. 18).

In Pflanzen ist die Trennung zwischen Keimbahnzellen und somatischen Zellen weniger eindeutig, da viele Pflanzenzellen **totipotent** sind. Eine einzelne Pflanzenzelle kann jeden Teil der Pflanze bilden, ob reproduktiv oder nicht. Dies gilt nicht für die meisten tierischen Zellen. Dennoch besitzen viele tierische Zellen das Potenzial, unterschiedliche Zelltypen zu bilden. Eine Zelle, die sich in viele Zelltypen zu differenzieren vermag, bezeichnet man als **Stammzelle**. Die Forschung an embryonalen Stammzellen wurde politisch zu einem stark umstrittenen Thema, weil sich diese Zellen potenziell zu einem Embryo entwickeln können. Allerdings ist auch die Forschung an adulten Stammzellen vielversprechend. So hoffen die Forscher darauf, Stammzellen zu identifizieren, die neue Neuronen bilden können, um Patienten mit einer Schädigung des Rückenmarks zu heilen.

Eukaryotische Zellen sind komplexer als Bakterien und enthalten in einer Zelle vielfache Kopien ihres Genoms. Sie sind außerdem spezialisiert, d.h., es gibt Zellen für die Reproduktion, einige Zellen sind Stammzellen, die sich zu somatischen Zellen differenzieren können, und einige Zellen sind in Form und Funktion spezialisiert.

Hefe und andere filamentöse Pilze in der Biotechnologie

Pilze sind für die Biotechnologie außerordentlich nützliche Organismen. Jeder, dem schon einmal ein Brot verschimmelt ist, hat eine Vorstellung davon, wie leicht sie sich kultivieren lassen. Pilze werden traditionell bei der Herstellung bzw. Verbesserung von Lebensmitteln eingesetzt. Einige finden beim Backen und Brauen Verwendung, andere dienen der Käseherstellung, der Produktion von Lebensmitteln wie Sojasoße oder sind Speisepilze. Bei der Herstellung von Käse wird eine Vielzahl von Pilzen eingesetzt. So



1.11 Somatische Mutationen

Der frühe Embryo trägt in jeder Zelle dieselbe genetische Information. Während der Teilung einer somatischen Zelle kann eine Mutation auftreten, die das aus ihr entstehende Organ oder Gewebe beeinflusst. Da die Mutation isoliert in einer einzelnen Vorläuferzelle stattgefunden hat, tragen andere Bereiche des Körpers und die Keimbahnzellen diese Mutation nicht. Daher wird die Mutation nicht an die Nachkommen weitergegeben.

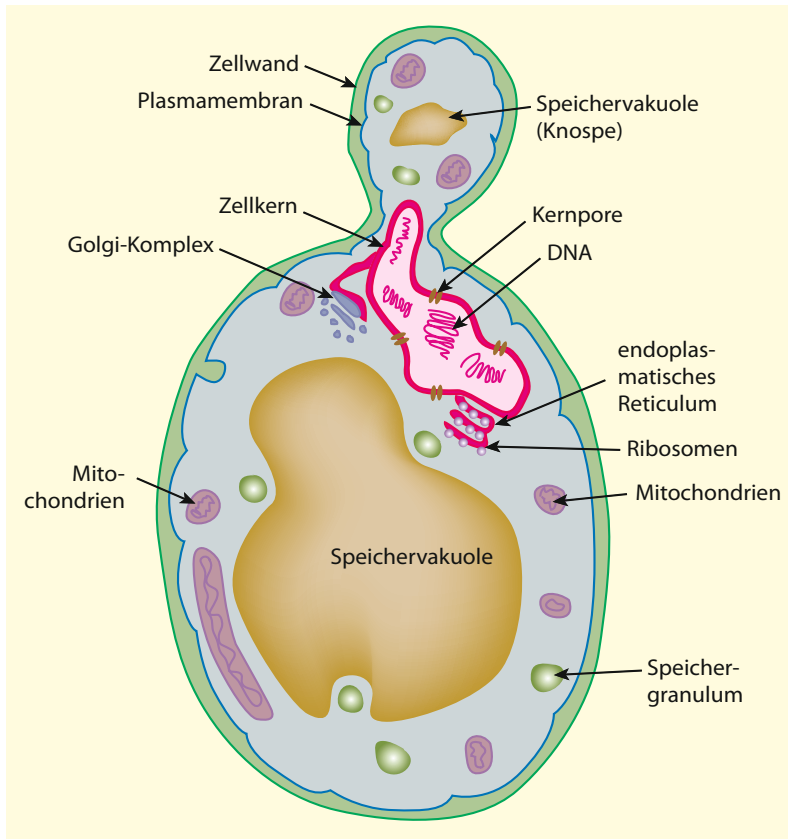
ist ein Schimmelpilz namens *Penicillium roqueforti* für die Bildung der blauen Adern in Käsesorten wie Roquefort verantwortlich. *P. candidum*, *P. caseicolum* und *P. camemberti* bilden die harten Oberflächen von Camembert und Brie. Sojasoße wird aus Sojabohnen hergestellt, die von *Aspergillus oryzae* vergoren werden.

Pilze spielen außerdem bei der Produktion von vielen industriellen Chemikalien und Pharmazeutika eine Rolle, von denen Penicillin das bekannteste ist. Es wird von *Penicillium notatum* in großen Tanks, die man als **Bioreaktoren** bezeichnet, synthetisiert. Zitronensäure ist ein chemischer Zusatzstoff in der Nahrungsmittelindustrie, der in Zitronen natürlich vorkommt. Hierdurch erhalten sie ihren sauren Geschmack. Die Säure wird etwa seit 1923 durch kultivierten *Aspergillus niger* hergestellt.

Ähnlich wie Bakterien hat Hefe in der Biotechnologie eine Doppelrolle. Sie bietet viele der Vorteile von Bakterien und ist außerdem ein Eukaryot. Hefen sind außerdem für die Produktion biotechnologischer Produkte von Bedeutung. Der in der Forschung am häufigsten verwendete Hefestamm ist die Back- oder Brauhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei handelt es sich um den gleichen kleinen Organismus, der den Alkohol im Bier produziert und Brotteig durch die Freisetzung von Kohlendioxid aufgehen lässt.

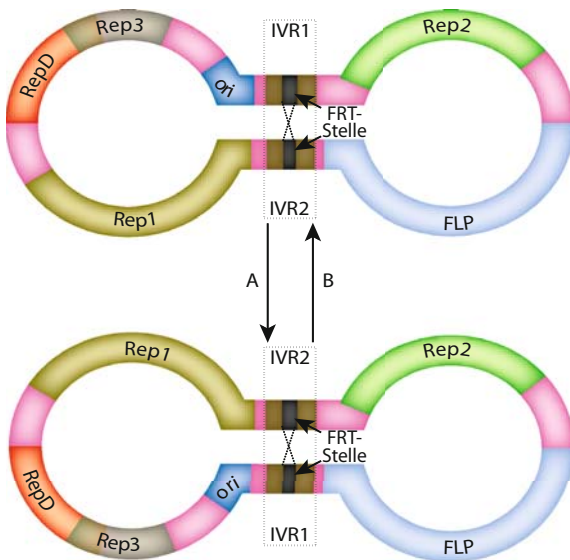
Hefe ist ein einzelliger Eukaryot, dessen zelluläre Bestandteile in Kompartimente unterteilt sind (Abb. 1.12). Wie bei allen Eukaryoten ist das Genom der Hefe von einer **Kernhülle** umgeben. Das Innere des Zellkerns und das Cytoplasma sind voneinander getrennt, doch sie stehen über gesteuerte Kanäle (**Kernporen**) miteinander in Verbindung. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt 16 lineare Chromosomen. Diese weisen **Telomere** und **Centromere** auf und sind in Bakterien nicht vorhanden. Das Hefegenom war das erste eukaryotische Genom, das vollständig sequenziert wurde. Es umfasst 12 Mb DNA mit ungefähr 6000 unterschiedlichen Genen. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten besitzen Hefegene nur sehr wenige **Introns** (s. Kap. 2). Im Cytoplasma der Hefezelle befinden sich Organellen wie das endoplasmatische Reticulum, der Golgi-Apparat und Mitochondrien.

Ähnlich wie Bakterien wachsen Hefen als einzelne Zellen. Eine Hefekultur besteht aus identischen Zellen, wodurch genetische und biochemische Untersuchungen einfacher werden. Das Kulturmedium kann flüssig oder auch fest sein, und die Kultur lässt sich über die Menge und die Zusammensetzung der Nährstoffe sowie über die Temperatur und die Wachstumszeit kontrollieren. Unter idealen Bedingungen verdoppelt sich die Zellzahl innerhalb von 90 Minuten; bei *E. coli* sind es dagegen 20 Minuten. Ob-



1.12 Struktur einer Hefezelle

Diese sich teilende Hefezelle beginnt die Zellkomponenten aufzuteilen. Die Knospe wächst und wird schließlich von der Mutter (unteres Oval) freigesetzt; auf deren Zellwand bleibt eine Narbe zurück.



1.13 Das 2-µm-Plasmid aus Hefe

Dargestellt sind zwei verschiedene Formen des Plasmids. Das Enzym Flp-Rekombinase erkennt die FRT-Stellen und rekombiniert sie. Dadurch wird eine Hälfte des Plasmids relativ zur anderen Hälfte invertiert.

wohl langsamer als bei Bakterien, ist das Wachstum einer Hefezelle im Vergleich zu anderen Eukaryoten schnell. Wie Bakterien lassen sich Hefezellen für Wochen im Kühlschrank aufbewahren und können über Jahre bei -70°C tiefgefroren werden.

Den Bakterien ganz ähnlich, enthalten auch einige Hefen in ihren Zellkernen extrachromosomale Elemente. Das am weitesten verbreitete Element ist ein Plasmid mit der Bezeichnung **2-µm-Ring**. Wie die Chromosomen aller Eukaryoten ist die DNA dieses Plasmids ebenfalls um Histone gewunden. Das Plasmid wird auch als Klonierungsvektor genutzt (s. Kap. 3), um heterologe Gene in Hefe zu exprimieren. Es trägt an gegenüberliegenden Seiten des Ringes zwei perfekte DNA-Sequenzwiederholungen (FRT-Stellen) und enthält außerdem ein Gen für das **Flp-Protein**, auch als **Flp-Rekombinase** oder **Flippase** bezeichnet. Dieses Enzym erkennt die FRT-Stellen und invertiert eine Hälfte des Plasmids relativ zur anderen über DNA-Rekombination (Abb. 1.13). Flippase rekombiniert alle DNA-Segmente mit FRT-Stellen, unabhängig davon, in welchem Organismus sie vorkommen. Somit lässt sich die Flippase einset-

zen, um transgene höhere Organismen herzustellen (s. Kap. 15). In Pflanzen wird ein vergleichbares System, Cre (Rekombinase) mit LoxP-Stellen, in ähnlicher Weise genutzt (s. Kap. 14).

Hefe bietet für die Biotechnologie viele Vorteile. Sie ist ein schnell wachsender einzelliger, eukaryotischer Organismus mit Chromosomen, die wie das menschliche Genom Telomere und Centromere besitzen. Hefezellen haben plasmidähnliche extrachromosomale Elemente, die für die Untersuchung von neuen Genen eingesetzt werden.

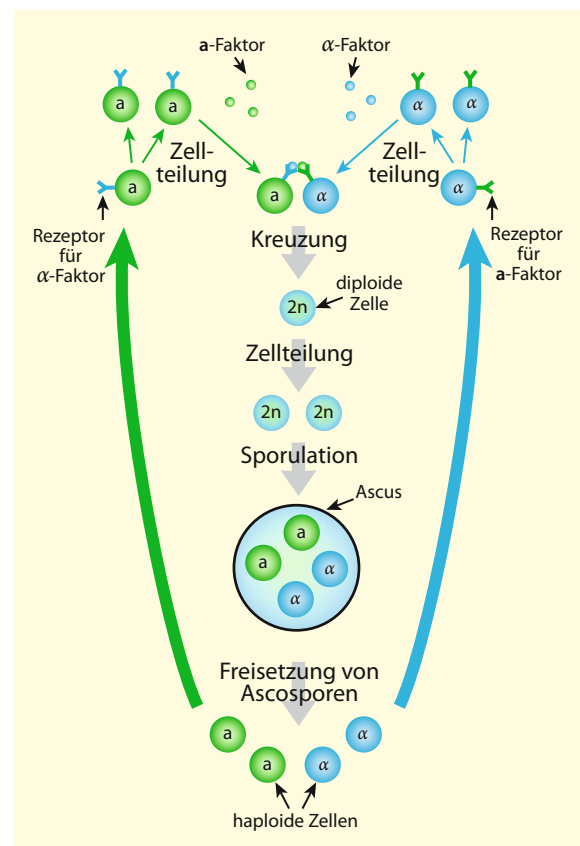
Kreuzungstypen der Hefe und Zellzyklus

Hefezellen wachsen und teilen sich durch Knospung. Zelluläre Organellen wie Mitochondrien und einige zelluläre Proteine werden in der wachsenden **Knospe** abgetrennt, und schließlich entsteht während der Mitose ein weiterer Zellkern. Hat die Knospe eine ausreichende Größe erreicht, wird die neue Tochterzelle freigesetzt, wobei auf der Oberfläche der Mutterzelle eine Narbe zurückbleibt. Durch Knospung und die damit verbundene mitotische Teilung des Genoms entstehen genetisch identische Zellen.

Hefe durchläuft in ihrem Lebenszyklus diploide und haploide Phasen, was die genetische Analyse erheblich vereinfacht. Die meisten in der Natur vorkommenden Hefen sind diploid, sie besitzen zwei Genomkopien. Unter ungünstigen Umweltbedingungen durchläuft die Hefe eine Meiose, durch die **haploide Sporen** gebildet werden. Diese Sporen befinden sich in einem **Ascus**, man bezeichnet sie daher als **Ascosporen**. Sie werden aus dem Ascus freigesetzt. Gelangen sie in eine andere, nährstoffreichere Umgebung, keimen sie aus. Im Labor lassen sich die haploiden Zellen isolieren und separat kultivieren, doch in der Natur fusionieren haploide Zellen rasch miteinander, und es entstehen wieder diploide Zellen (Abb. 1.14). Dieser Lebenszyklus der Hefe erlaubt es, ganz so wie mit Mendels Erbsen, einzelne Gene während der Segregation zu verfolgen und die Vererbungsmuster zu analysieren. Die kurze Generationsdauer der Hefe ergibt jedoch höhere Individuenzahlen und mehr Generationen, die sich untersuchen lassen.

Wie die Meiose beim Menschen weibliche und männliche Gameten erzeugt, so führt die Meiose

bei der Hefe zu haploiden Zellen unterschiedlicher Kreuzungstypen. Da ihre Struktur gleich ist, ist die Bezeichnung für die Kreuzungstypen a und α statt männlich und weiblich. Eine Fusion kann ausschließlich zwischen unterschiedlichen Kreuzungstypen stattfinden, d.h. nur eine a - und eine α -Zelle können sich vereinen und eine diploide Zelle bilden. Jeder Kreuzungstyp synthetisiert ein bestimmtes Paarungspheromon, das in die Umgebung sekretiert wird. Begegnet eine a -Zelle einem α -Pheromon, dann bindet das α -Pheromon an einen Rezeptor (den α -Rezeptor) auf der Oberfläche der a -Zelle und bereitet die Hefezelle auf die Fusion vor und umgekehrt. Die beiden Zellen



1.14 Sich abwechselnde haploide und diploide Phasen der Hefe

Haploide Zellen liegen in zwei verschiedenen Formen a und α vor. Diese exprimieren Paarungspheromone, den a -Faktor und den α -Faktor, die die jeweils andere Form anlocken. Binden die Pheromone an Rezeptoren auf dem jeweils anderen Zelltyp, dann werden die beiden haploiden Zellen kompetent für eine Fusion zu einer diploiden Zelle. Diploide Zellen sporulieren unter wachstumsbegrenzenden Bedingungen, ansonsten bilden diese Zellen durch Knospung genetische Klone.

fusionieren und die Genome werden zu einem Genom vereint. Der Austausch von Genen bei der sexuellen Fortpflanzung ist für die Evolution von großer Bedeutung, da neue Genkombinationen entstehen, die unter bestimmten Bedingungen vorteilhaft sein können.

Hefezellen bestimmen den Kreuzungstyp über einen genetischen Locus, der als **MAT-Locus** bezeichnet wird. Dieser Bereich der DNA umfasst zwei Gene, die in entgegengesetzter Richtung transkribiert werden. In haploiden α -Zellen sind dies die Gene des Locus *MATa1* und *MATa2*, in α -Zellen sind es *MAT α 1* und *MAT α 2*. Während der Meiose werden die Gene an diesem Locus durch Rekombination ausgetauscht, sodass die eine Hälfte der Sporen *MATa1* und *MATa2* besitzen, die andere Hälfte hingegen *MAT α 1* und *MAT α 2*. Die Genprodukte des MAT-Locus kontrollieren die Expression des Paarungspheomens und des Rezeptors in den haploiden Zellen.

Unter nährstoffreichen Bedingungen bildet Hefe durch Knospung genetische Klone. Durch sexuelle Fortpflanzung können Hefen, wie andere Eukaryoten auch, ihre Genome genetisch neu kombinieren. Die beiden Formen haploider Hefezellen sind α und α ; sie entsprechen funktionell einer männlichen und einer weiblichen Zelle. Die haploiden Zellen verschmelzen und es entsteht eine neue, genetisch einzigartige diploide Zelle.

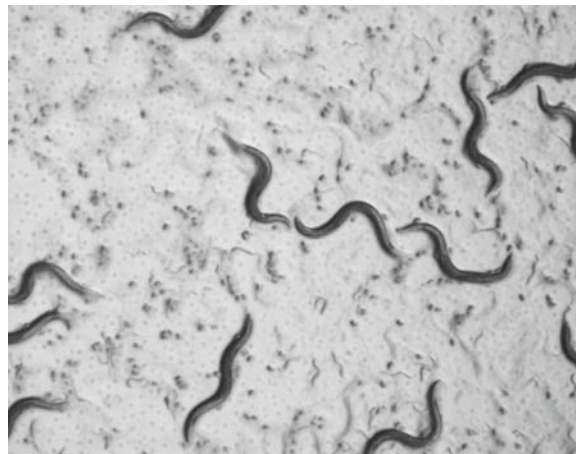
Vielzellige Modellorganismen in der Forschung

Einzeller bieten viele Vorteile, doch um die Physiologie des Menschen verstehen zu können, sind Informationen über Wechselwirkungen zwischen Zellen erforderlich. Obwohl einzellige Organismen miteinander interagieren, ist es doch nicht dasselbe wie bei einem Vielzeller, bei dem eine Zelle auf allen Seiten von anderen Zellen umgeben ist. Die Position der Zellen beeinflusst sowohl ihre Funktion als auch ihre Entwicklung. Die Zellen unserer Haarfollikel unterscheiden sich z.B. von denen unserer Haut. Knochenzellen weisen erhebliche Unterschiede zu den langen Nervenzellen in unserem Rückenmark auf. Viele der grundlegenden Arbeiten über die Wechselwirkungen zwischen Zellen, die Entwicklung von Vielzellern und zum Verständnis der Zellphysiologie in unterschiedlichen Geweben wurden an dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* durchgeführt. Obwohl es sich um einen vielzelligen

Organismus handelt, ist er im Vergleich zu Säugern und anderen Wirbeltieren relativ einfach gebaut.

Caenorhabditis elegans, ein kleiner Fadenwurm

C. elegans ist ein kleiner Fadenwurm, der sich im Boden von Bakterien ernährt (Abb. 1.15). Es gibt zwei Geschlechter – selbstbefruchtende Hermaphroditen (Zwitter) und Männchen. Dadurch sind genetische Untersuchungen der Selbstbefruchtung und der gegenseitigen Befruchtung möglich. Der Körper hat die Form einer einzelnen, nichtsegmentierten Röhre, die von einer Cuticula überzogen ist, um eine Austrocknung zu verhindern. *C. elegans* besteht aus 959 somatischen Zellen, von denen mehr als 300 Neuronen sind. Am Kopf sind viele Sinnesorgane lokalisiert, die dem Geruch, dem Geschmack, der Temperaturwahrnehmung und dem Tasten dienen – Augen fehlen jedoch. Ein Nervenring dient als Gehirn und entlang des Rückens verläuft ein Nervenbündel. Der Verdauungstrakt besteht aus einem Pharynx, gefolgt von dem Darm und dem Anus. Der Wurm verfügt über 81 Muskelzellen, die sinusförmige Bewegungen ermöglichen. Das Reproduktionssystem nimmt den meisten Platz im Wurm ein. Bei Hermaphroditen ist der Schwanz lang und läuft spitz zu, bei Männchen endet er dagegen stumpf. Der Hermaphrodit besitzt eine Vulva für die Eiablage. Die Spermien stammen entweder von dem Zwitter selbst oder von einem männlichen *C. elegans*.



1.15 *Caenorhabditis elegans*

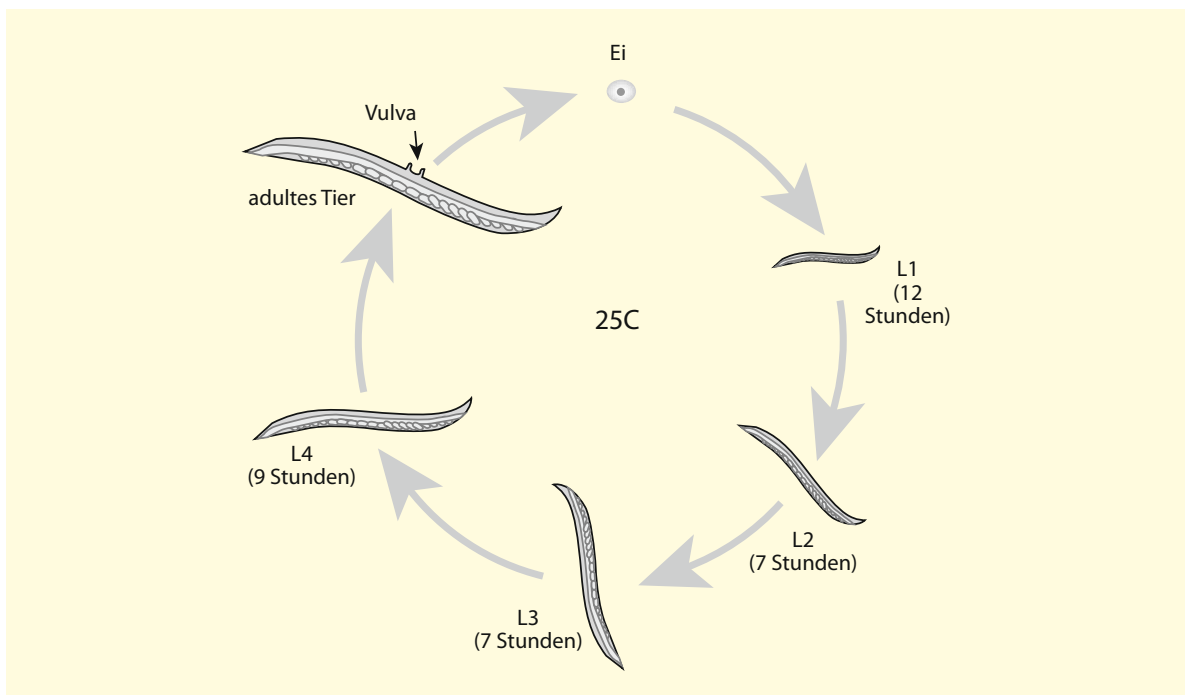
Mit freundlicher Genehmigung von Jill Bettinger, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA.

C. elegans ist für Molekularbiologie und Genetik in vielerlei Hinsicht vorteilhaft. Die Organismen sind transparent und können lebend mithilfe verschiedener Fluoreszenzmethoden untersucht werden. Sie zeigen viele physiologische Eigenschaften, die denen höherer Tiere ähneln. Sie durchlaufen einen programmierten Zelltod, und die daran beteiligten Gene sind Genen des Menschen ähnlich (s. Kap. 20). *C. elegans* wird verwendet, um Entwicklung, Altern, Geschlechtsdimorphismus, Alkoholstoffwechsel und viele andere, den Menschen betreffende Phänomene zu untersuchen.

Der Lebenszyklus von *C. elegans* ist für die Forschung vorteilhaft. Eine Generation dauert ungefähr drei Tage. Zunächst verschmelzen im Körper des Hermaphroditen Spermium und Eizelle und eine einzellige Zygote entwickelt sich. Nachdem die Larve geschlüpft ist beginnen die Larvenstadien. Sie unter-

teilen sich in vier Stadien L1 bis L4. Die Geschlechtsorgane entwickeln sich am Übergang von L2 zu L3. Spermien und Eizellen reifen spät im L3-Stadium vor dem Übergang zum L4-Stadium, L4 ist das adulte Tier (Abb. 1.16). Da *C. elegans* ein Hermaphrodit ist, lässt sich der Organismus leicht genetisch untersuchen. Selbstbefruchtung erlaubt die unkomplizierte Vermehrung von homozygoten Organismen. Dies ist für die Isolierung von Mutanten sehr nützlich.

C. elegans ist ein vielzelliger, eukaryotischer Modellorganismus. Dieser Organismus wird in der biotechnologischen Forschung eingesetzt, weil er leicht zu kultivieren und transparent ist. Es gibt zudem eine zwittrige Form (Hermaphrodit), sodass sich entweder genetische Klone erzeugen lassen oder genetisch neue Organismen.



1.16 Lebenszyklus von *Caenorhabditis elegans*

Wenn das Spermium von *C. elegans* mit einer Eizelle verschmilzt, entwickelt sich ein kleiner Wurm (L1). Die Larve durchläuft viele Stadien, bis sich ein reproduktionsfähiges, adultes Tier entwickelt hat. *C. elegans* besitzt sechs unterschiedliche Chromosomen: fünf Autosomen und ein X-Chromosom. Der Wurm ist diploid, enthält also zwei Chromosomensätze. Besitzt ein Embryo zwei X-Chromosomen, dann entwickelt er sich zu einem Hermaphrodit. Besitzt er nur ein X-Chromosom, dann wird er zu einem Männchen. Diese machen allerdings nur bis zu 0,05 % einer normalen Population aus. Das Genom umfasst 97 Mb und wurde im Jahre 1998 vollständig sequenziert. Nahezu 27 % des Genoms sind codierende Sequenzen mit etwa 19 000 Genen, von denen mehr als 900 mRNA codieren. Ein durchschnittliches Gen besteht aus fünf Introns und ist etwa 3000 Basenpaare lang. Intron-DNA macht etwa 26 % des Gesamtgenoms aus. Die restlichen 47 % des Genoms sind intergenisch und nichtcodierend.

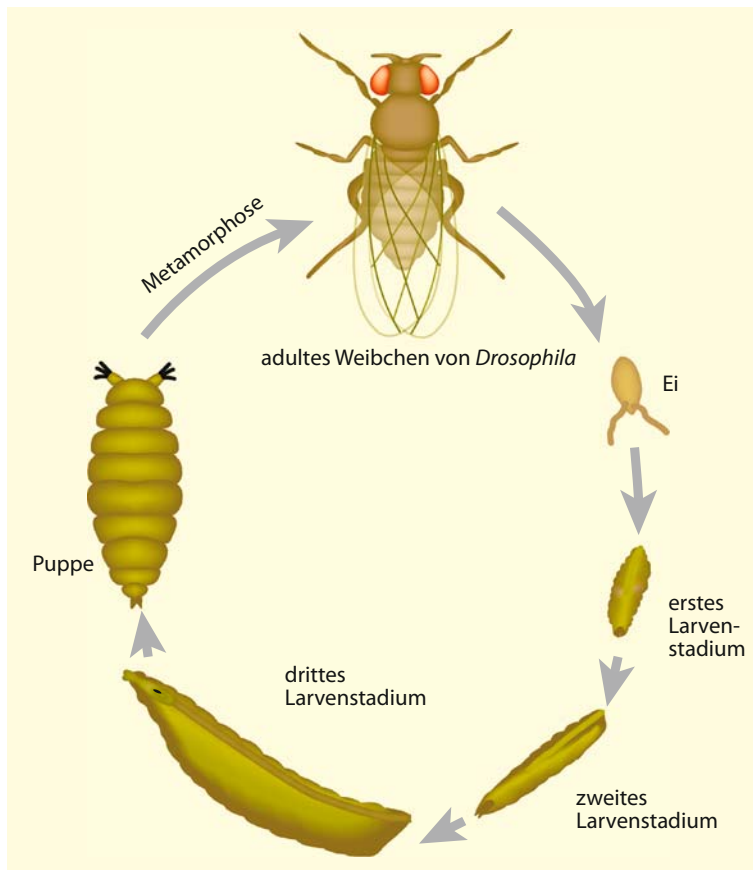
***Drosophila melanogaster*, die Taufliege**

Ein anderer vielzelliger Organismus, der aufgrund seiner Genetik vielfach verwendet wird, ist *Drosophila melanogaster*, in der Regel einfach als *Drosophila* (Taufliege) bezeichnet. Das Insekt ist ungefähr 3 mm lang und häufig an reifem, faulem Obst zu finden. Die Fliegen lassen sich im Labor leicht kultivieren. Sie benötigen eine Nahrungsquelle und werden in mit Baumwolle verschlossenen Flaschen gehalten. Ihre gesamte Lebensspanne umfasst zwei Wochen und beginnt mit einem Ei von etwa 0,5 mm Länge (Abb. 1.17). Der Embryo entwickelt sich innerhalb eines Tages im Ei und schließlich schlüpft eine wurmähnliche Larve. Es gibt drei Larvenstadien, die sich ein, zwei und vier Tage nach dem Schlüpfen entwickeln. Jede Larve wächst und frisst kontinuierlich und häutet sich zur nächsten Larvenform. Das dritte Larvenstadium entwickelt zu einer unbeweglichen Puppe, die in der Regel an der Innenseite der Glasflasche hängt, wo sie für etwa sechs Tage verbleibt. Während dieser Zeit

verwandelt sich die Larve in eine beflügelte, adulte Fliege. Flügel, Beine, Antennen, der segmentierte Körper, die Augen und das Haar werden gebildet.

Der Schwerpunkt in der *Drosophila*-Forschung ist die Genetik. Es sind viele unterschiedliche Mutationen bekannt. Dazu gehören einfache Veränderungen wie eine längere oder kürzere Körperbehaarung, aber auch dramatische Veränderungen wie die Verdopplung von Körpersegmenten. Diese führen dazu, dass einige *Drosophila*-Mutanten vier Flügel oder zusätzliche Beine besitzen. Die Untersuchung dieser Mutanten ermöglichte die Identifizierung vieler Gene, die den grundlegenden Bauplan der Fliege, und aufgrund der Homologie auch den des Menschen, bestimmen. Das *Drosophila*-Genom wurde bereits sequenziert und umfasst 165 Mb DNA, die sich auf drei Autosomen und die Geschlechtschromosomen X und Y verteilen. Es werden 12 000 Gene im Genom vermutet.

Während des schnellen Wachstums in den Larvenstadien bleibt die Zahl der Zellen nahezu konstant, in dieser Zeit nimmt die Größe der Zellen jedoch deutlich zu. Damit diese riesigen Zellen ord-

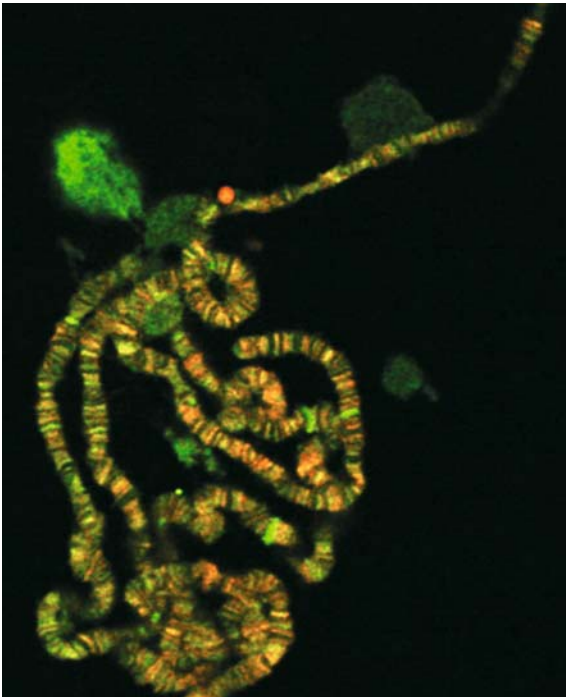


1.17 Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster*

Drosophila, die Taufliege, beginnt als kleines Ei, das sich zu einem Wurm (Made) entwickelt. Nach einer Reihe von Larvenstadien verpuppt sich die Made, und in der Puppe entwickelt sich das adulte Tier.

nungsgemäß funktionieren, müssen große Mengen zusätzlicher Proteine und mRNA synthetisiert werden. Die Chromosomen verdoppeln sich Hunderte Male, sodass vielfache Genkopien entstehen. Trotz dieser Vervielfältigung trennen sich die Chromosomen nicht, sondern bleiben miteinander verbunden, wodurch dicke **polytäne Chromosomen** entstehen (Abb. 1.18). Diese sind so groß, dass sie unter dem Lichtmikroskop sichtbar sind. Die polytänen Chromosomen haben charakteristische Bandenmuster, wobei jeder Abschnitt auf jedem Chromosom einzigartig ist. Mithilfe des Bandenmusters war es möglich, einige Mutationen zu lokalisieren. So verändert z.B. eine Deletion, die im adulten Tier weiße Augen hervorruft, das Muster auf dem entsprechenden polytänen Chromosom. Die Mutation lässt sich so leicht auf dem Chromosom kartieren.

Die echte sexuelle Fortpflanzung von *Drosophila* erlaubt genetische Manipulationen. Die komplexen Veränderungen, die während der Metamorphose von der Puppe zur adulten Fliege stattfinden, sind zwei wichtige Eigenschaften, die von Forschern untersucht werden.



1.18 Polytänes Chromosom

Fluoreszenzfärbung eines polytänen Chromosoms von *Drosophila*.

Zebrafische sind Modellorganismen für die Entwicklungsgenetik

Der kleine Zebrafisch (*Danio rerio*) ist ein einfacher Vertebrat, der in der molekularbiologischen Forschung eingesetzt wird. Außerdem wird der verbreitete Fisch in Zoohandlungen für die Haltung in Süßwasseraquarien verkauft. Die Eigenschaften, die ihn als Bewohner eines Aquariums so beliebt machen, sind auch für die Forschung interessant. Er ist leicht zu halten und zu züchten. Außerdem existiert eine Vielfalt an Mutationen, wodurch der Fisch für die genetische Forschung geeignet ist. Das erwachsene Tier ist etwa 2,5 cm lang, mit schwarzen horizontalen Streifen entlang seines Rumpfes (Abb. 1.19). Das Weibchen legt ungefähr 200 Eier gleichzeitig, sodass nach einer Befruchtung viele Nachkommen analysiert werden können. Die Embryos sind sehr transparent, wodurch sich Auswirkungen von Mutationen auf die embryonale Entwicklung leicht erkennen lassen. Außerdem können unterschiedliche Zellen entweder gezielt zerstört oder auch an neue Positionen verpflanzt werden, um den Einfluss auf deren Entwicklung zu beobachten. Solche Versuche sind sehr hilfreich, um die Auswirkung der Position auf die zelluläre Entwicklung zu ermitteln. Die Embryos entwickeln sich in etwa 24 Stunden aus einer einzelnen Zelle zu einem winzigen Fisch, sodass sich Untersuchungen zur Entwicklung relativ schnell durchführen lassen.

Zebrafische sind Schlüsselorganismen für Untersuchungen der embryonalen Entwicklung, weil sich ihre Nachkommen außerhalb der Mutter entwickeln.



1.19 Der Zebrafisch, *Danio rerio*

Dieser Fisch wird in genetischen Untersuchungen, der Zellbiologie und der Entwicklungsbiologie als Modellorganismus für Vertebraten eingesetzt.

Mus musculus, die Maus, ist dem Menschen auf genetischer Ebene ähnlich

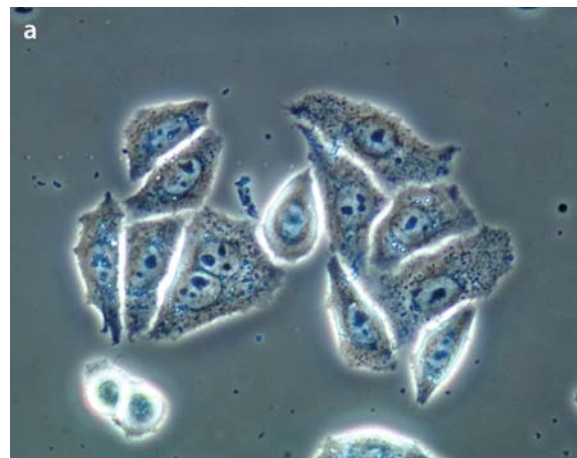
Der Modellorganismus, der dem Menschen am ähnlichsten ist, ist die Maus. Ihr Genom umfasst etwa 2600 Mb auf 20 unterschiedlichen Chromosomen. Weniger als 1 % der Gene haben im Menschen kein entsprechendes Gegenstück, sodass sich die Mausgenetik leicht auf den Menschen übertragen lässt. Mäuse sind genetisch leicht zu manipulieren und Tiere mit einem oder mehreren inaktivierten Genen (Knockout-Mäuse) sind relativ einfach herzustellen (s. Kap. 15). Neben genetischen Deletionen lassen sich auch Gene in die Maus einschleusen und in ihr exprimieren, so entstehen **transgene** Mäuse (s. Kap. 15). Die Auswirkung solcher genetischer Manipulationen auf das Wachstum, die Entwicklung oder die Physiologie können untersucht werden.

Forscher betrachten Mäuse als sehr menschenähnlich, weil sie viele gemeinsame Gene haben.

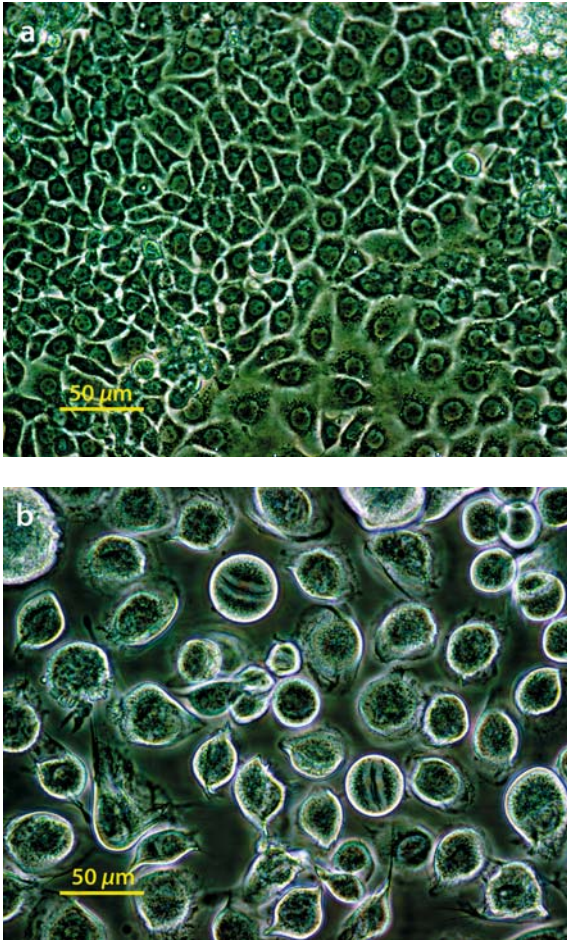
In vitro-Kulturen von tierischen Zellen

Eine weitere Möglichkeit, sich der menschlichen Physiologie zu nähern, ist die Untersuchung von Säugerzellen, die *in vitro* angezogen werden (Abb. 1.20). Bislang wurden viele unterschiedliche Zelllinien von Menschen und Affen hergestellt. Als Kulturgefäße dienen Plastischalen oder Flaschen, die Kulturmedien mit Wachstumsfaktoren und Nährstoffen enthalten. Die Zelllinien müssen bei 37 °C gezogen werden und benötigen eine CO₂-reiche Atmosphäre. **Adhärenze Zelllinien** haften an den Plastischalen und teilen sich auch auf ihnen, **Suspensionskulturen** dagegen wachsen und teilen sich im Medium. Die meisten Zelllinien enthalten einen speziellen Zelltyp eines bestimmten Gewebes wie Niere, Leber, Herz usw., aus denen schon viele Linien hergestellt wurden. Die ursprünglichen Zelllinien können sich in Kultur nicht unbegrenzt teilen. Solche Primärzellen lassen sich nur für eine kurze Zeit erhalten. Abhilfe schuf hier die Verwendung von Krebszellen, die sich unaufhörlich teilen (s. Kap. 18). Diese Zelllinien sind unsterblich und können im Prinzip unbegrenzt kultiviert werden.

Der wichtigste Grund für die Verwendung menschlicher Zellkulturen ist die Möglichkeit, genetische Untersuchungen durchzuführen. In kultivierten Zellen lassen sich unterschiedliche Gene exprimieren und die Wirkung auf die Physiologie analysieren. Außerdem eignen sie sich zur Untersuchung von Deletionen oder Mutationen. Obwohl die Zellen sich nicht im Menschen befinden, ist ihre genetische Ausstattung identisch mit Zellen, die Teil eines Organismus sind. Zellkulturen aus Säugetieren sind auch für die Produktion von rekombinan-



1.20 In vitro wachsende, menschliche HeLa-Zellen
HeLa-Zellen wurden im Jahre 1950 aus einem Tumor gewonnen, den man damals Henriette Lack entnommen hatte, die an einem Zervikalkarzinom litt. Seitdem wurden die Zellen ununterbrochen kultiviert. **a** Zellen im Phasenkontrast. **b** Zellen im differentiellen Interferenzkontrast. Mit freundlicher Genehmigung von Michael W. Davidson, Optical Microscopy Group, National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, Tallahassee, Florida.



1.21 Insektenzellen in Kultur

a HvT1-Zellen aus dem Hoden der Amerikanischen Tabakeule heften sich fest an die Oberfläche der Kulturschale.
b TN368-Zellen aus dem Ovar des Kohlspanners lagern sich dagegen nur locker an. Mit freundlicher Genehmigung von Dwight E. Lynn, Insect Biocontrol Lab, USDA, Beltsville, MD.

ten Proteinen von Bedeutung. Die Proteine werden anschließend für medizinische Zwecke oder andere biotechnologische Anwendungen isoliert und gereinigt.

Zelllinien wurden auch aus Insekten gewonnen (Abb. 1.21). Diese dienen hauptsächlich der Expression von heterologen Proteinen in der biotechnologischen Industrie. Insektenzellen werden gegenüber Säugerzellen bevorzugt, da sie für ihr Wachstum weniger Nährstoffe benötigen und sich in serumfreiem Medium halten lassen. Säugerzellen hingegen erfordern Serum aus Kuhfeten, das sehr teuer ist und nicht unbegrenzt zur Verfügung steht. Außerdem

wachsen die Zellen von Insekten bei geringeren Temperaturen und ohne Kohlendioxid, wodurch man auf spezielle Inkubatoren verzichten kann.

Insektenzellen werden in der Forschung verwendet, um Viren zu untersuchen, die durch Insekten zwischen Pflanzen übertragen werden, und um Signalwege zu identifizieren. Insektenzelllinien stammen hauptsächlich von *Spodoptera frugiperda* (Herbstseerwurm), *Trichoplusia ni* (Kohlspanner), *Drosophila melanogaster* (Taufliege), *Heliothis virescens* (Amerikanische Tabakeule), der Stechmücke und anderen. Die am weitesten verbreiteten Zelllinien sind die aus dem Ovargewebe von *S. frugiperda*, zu denen Sf9- und Sf21-Zellen gehören, solche aus den embryonalen Zellen von *T. ni* (enthalten die „high five“-Zelllinien) und Zelllinien aus späteren Stadien des *Drosophila*-Embryos (z.B. Schneider-S2-Zellen).

Die Untersuchung von Zellen in einer Kulturschale statt in einem Organismus bietet dem Forscher eine weitere Möglichkeit, Gene zu studieren. Die Zelllinien sind nützlich für genetische Manipulationen, wie die Expression neuer Gene oder die Deletion von existierenden Genen.

Arabidopsis thaliana, eine Blütenpflanze als Modellorganismus

Der in der pflanzlichen Genetik und Molekularbiologie am häufigsten verwendete Modellorganismus ist das Kraut *Arabidopsis thaliana*, Ackerschmalwand oder auch Schotenkresse genannt (Abb. 1.22). Die Pflanzenforschung ist noch nicht so weit fortgeschritten wie die Erforschung des Menschen, doch werden hier große Anstrengungen unternommen. Der Anbau verschiedener Kulturpflanzen ist für die Ernährung der Weltbevölkerung von außerordentlicher Bedeutung. Die Investitionen in die Erforschung der am häufigsten als Nahrungsmittel genutzten Kulturpflanzen wie Reis, Sojabohne, Weizen und Mais sind enorm. Diese Pflanzen besitzen riesige Genome und die meisten sind polyploid – sogar hexaploid (wie beim Weizen). Um die grundlegenden biologischen Vorgänge zu erforschen ist daher ein Modellorganismus essenziell. *Arabidopsis* zeigt nahe-



1.22 *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanze, die in der molekularbiologischen Forschung am häufigsten als Modellorganismus verwendet wird, ist *A. thaliana* aus der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jeremy Burgess, Science Photo Library.

zu dieselben Reaktionen auf Stress und Erkrankungen wie Kulturpflanzen. Außerdem sind viele Gene, die an Reproduktion und Entwicklung beteiligt sind, homolog zu den Genen in Pflanzen mit komplexen Genomen.

Arabidopsis thaliana verfügt über einige nützliche Eigenschaften. Erstens lässt sich die Pflanze im Labor leicht kultivieren. Sie ist klein und passt sich ihrer Umgebung an. Sind Nährstoffe reichlich vorhanden und gibt es viel Platz, dann wächst sie bis zu einer Höhe und Breite von etwa 30 cm. Ist die Umgebung jedoch eine kleine Kulturschale im Labor, dann können Höhe und Breite nur ungefähr 1 cm betragen. Bei jeder Größe bildet die Pflanze Blüten und Samen. Eine vollständige Generation vom Samen bis zur ausgewachsenen Pflanze dauert 6–10 Wochen, was für

eine Pflanze relativ wenig ist. (Bei Mais oder Soja ist eine Vegetationsperiode gleichbedeutend mit nur einer Generation.) Jede *Arabidopsis*-Pflanze produziert viele Samen – ein Vorteil für genetische Untersuchungen. Ähnlich wie Hefe kann *Arabidopsis* in der haploiden Phase gehalten werden.

Für eine Pflanze besitzt *Arabidopsis* ein kleines Genom, das 125 Mb umfasst, verteilt auf fünf Chromosomen. Das Genom wurde im Jahr 2000 vollständig sequenziert, wodurch es Forschern schließlich gelang, ungefähr 25 000 Gene und andere bedeutende Sequenzinformationen zu identifizieren. Auch Reis wurde sequenziert. Er besitzt etwa 40 000 bis 50 000 Gene, womit er die für den Menschen geschätzte Zahl an Genen überschreitet. Reis (und zweifelsohne viele andere Pflanzen) ist somit möglicherweise weiter entwickelt als wir Menschen.

Auch die Pflanzenforschung nutzt für Untersuchungen einen Modellorganismus, *Arabidopsis thaliana*. Die Pflanze wird aufgrund ihrer geringen Größe, ihrer geringen Ansprüche und ihres kleinen Genoms eingesetzt.

Viren in der genetischen Forschung

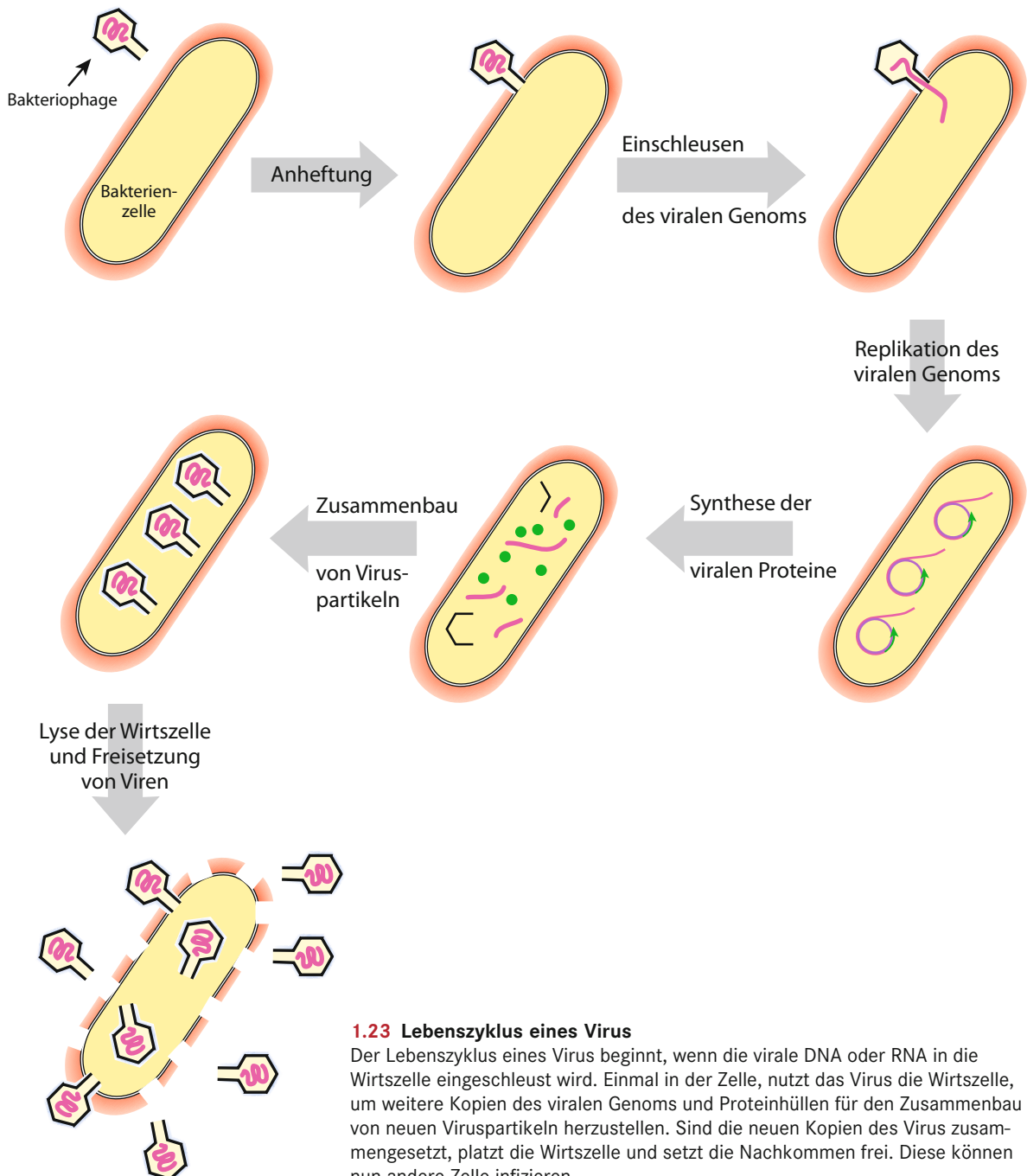
Viren sind Einheiten an der Grenze zum Leben. Doch im Gegensatz zu lebenden Organismen vermögen Viren nicht außerhalb eines Wirtes zu überleben. Viren dringen als Pathogene in Wirtszellen ein und produzieren mit deren Hilfe virale Nachkommen. Sie sind im Grunde genommen einfach aber doch sehr mächtig. Viren bestehen aus einer Proteinhülle, als **Capsid** bezeichnet, die ein Genom aus RNA oder DNA einschließt. Ein solches Partikel nennt man **Virion**. Es verfügt über keinen eigenen Energiestoffwechsel und kann auch das eigene Genom nicht duplizieren. Das Virus nutzt dafür die Wirtszelle.

Es gibt viele verschiedene Formen von Viren. Sie können jeden lebenden Organismus, vom Bakterium bis hin zu Menschen oder Pflanzen, befallen. Virale Erkrankungen des Menschen sind weit verbreitet und die meisten rufen nur geringe Symptome hervor. Wird ein Mensch beispielsweise von einem Rhinovirus infiziert, dann beginnt die Nase zu laufen, weitere Symptome einer Erkältung zeigen sich und das Opfer

fühlt sich für ein paar Tage elend. Viren verursachen allerdings auch eine Reihe schwerer Erkrankungen wie AIDS, Pocken, Hepatitis oder das Ebola-Fieber.

Befällt ein Virus ein Bakterium, dann stirbt das infizierte Bakterium in der Regel. Viren, die Bak-

terien infizieren, werden auch als **Bakteriophagen** oder **Phagen** bezeichnet. Sie zerstören normalerweise die Bakterienzelle, wenn neue Viruspartikel hergestellt und freigesetzt werden. Wachsen Bakterien auf einer Agarplatte, dann sind sie auf dem Agar



1.23 Lebenszyklus eines Virus

Der Lebenszyklus eines Virus beginnt, wenn die virale DNA oder RNA in die Wirtszelle eingeschleust wird. Einmal in der Zelle, nutzt das Virus die Wirtszelle, um weitere Kopien des viralen Genoms und Proteinhüllen für den Zusammenbau von neuen Viruspartikeln herzustellen. Sind die neuen Kopien des Virus zusammengesetzt, platzt die Wirtszelle und setzt die Nachkommen frei. Diese können nun andere Zelle infizieren.

als wolkiger Belag sichtbar (**Bakterienrasen**). Ist die Bakterienkultur mit einem Bakteriophagen infiziert, dann sind die Bereiche, wo Bakterien durch den Virusbefall zerstört werden, als klare Zonen sichtbar (**Plaques**).

Bakteriophagen durchlaufen, wie andere Virentypen auch, folgenden Lebenszyklus (Abb. 1.23):

- a) Anheftung des Virions an die Wirtszelle
- b) Einschleusen des viralen Genoms in die Zelle
- c) Replikation des viralen Genoms
- d) Produktion von neuen viralen Proteinen
- e) Zusammenbau von neuen Viruspartikeln
- f) Freisetzung von neuen Virionen durch die Wirtszelle

Nicht jedes Virus tötet die Wirtszelle, und tatsächlich haben viele Viren eine latente Phase, in der sie in der Zelle ruhen und keine neuen Proteine oder Viren gebildet werden. Bei Tierzellen wird diese Phase als **Latenz** bezeichnet, bei Bakterien dagegen als **Lyso-genie**. (Im Gegensatz dazu nennt man die Phase des viralen Wachstums, in der die Wirtszelle zerstört wird, **lytische Phase**.) Gelegentlich wird ein Virus latent, wenn sich sein Genom in das Genom der Wirtszelle integriert und dort inaktiv bleibt, bis es durch einen äußeren Reiz reaktiviert wird. Das integrierte Virus bezeichnet man als **Provirus** oder im Fall eines befallenen Bakteriums als **Prophagen**.

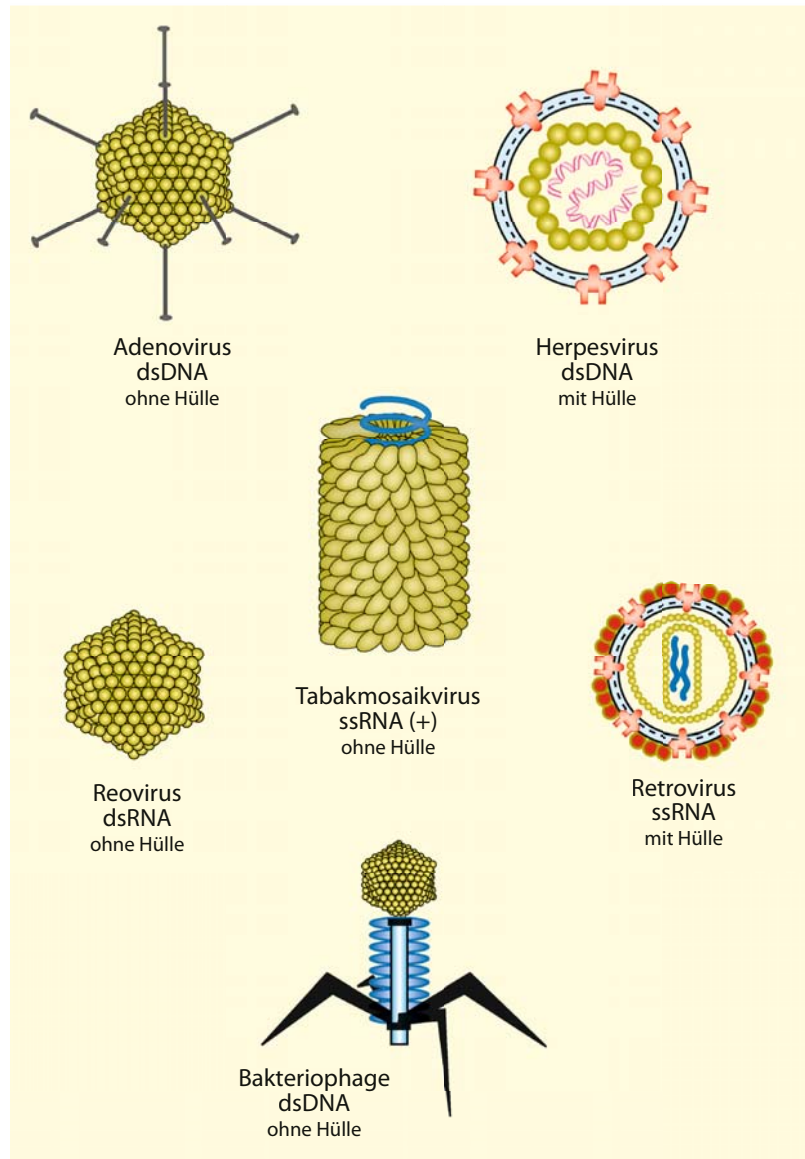
Die große Vielfalt von Viren lässt sich je nach Form des Capsids oder der Art des Genoms in Gruppen einteilen. Die drei Hauptformen sind sphärisch (kugelförmig), filamentös und komplex. Sphärische Viren bestehen aus 20 flachen, dreieckigen Platten und sind daher Ikosaeder. Komplexe Viren haben verschiedene Formen: Einige besitzen Schwanzfasern (Spikes), über die sich das Virus an die Wirtszelle heftet, ein lineares Segment, welches das DNA- oder RNA-Genom injiziert, und eine Struktur, die das Virusgenom enthält. Diese Form eines komplexen Virus ist unter den Bakteriophagen weit verbreitet, von denen viele in der molekularbiologischen Forschung eingesetzt werden, wie die Bakteriophagen T4, lambda und Mu (Abb. 1.24).

Die Größe von Virusgenomen variiert. Alle Genome enthalten jedoch ausreichend genetische Information, um die Wirtszelle so zu verändern, dass Kopien des viralen Genoms und Capsidproteine hergestellt werden. Das Virus benötigt mindestens ein Gen für die Replikation seines Genoms, eines für das Capsidprotein und eines für die Freisetzung der neuen Viren aus der Wirtszelle. Der Bakteriophage Q β infiziert Bakterien. Sein gesamtes Genom

umfasst nur 3500 Basenpaare und besteht aus nur vier Genen. Auf der anderen Seite besitzen komplexe Viren mehr als 200 Gene, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion der Wirtszelle aktiviert werden. Die Gene lassen sich, abhängig von den Zeitpunkten, in denen sie aktiv sind, in Kategorien einteilen. Einige Gene werden als **frühe Gene** bezeichnet, sie sind unmittelbar nach der Infektion des Wirtes aktiv. Die **späten Gene** sind nur aktiv, wenn das Virus schon einige Zeit im Wirt verbracht hat.

Virale Genome bestehen entweder aus DNA oder aus RNA, sie können doppel- oder einzelsträngig, linear oder ringförmig sein. Besitzen Viren eine einzelsträngige RNA als Genom, dann kann es sich bei der RNA entweder um einen **positiven ((+)-Strang)** oder einen **negativen ((-)-Strang)** handeln. Der positive Strang entspricht dem codierenden Strang und der negative dem Matrizenstrang (s. Kap. 2). Injiziert ein Virus seinen (+)-RNA-Strang in den Wirt, dann kann die RNA direkt als mRNA für die Proteinsynthese verwendet werden. Wird dagegen ein negativer Strang injiziert, muss die RNA zunächst in eine doppelsträngige Form (die **replikative Form** oder **RF**) überführt werden. In diesem Fall wird jeder Strang verwendet: der negative für die Synthese von mehr positiv strängigen Genomen und der positive für die Proteinsynthese.

Einige Viren haben als Genom sowohl RNA als auch DNA (Abb. 1.25). **Retroviren** infizieren Tiere. Zu ihnen gehört z.B. HIV (engl. *human immunodeficiency virus*). Das Genom im Retroviruspartikel ist eine einzelsträngige RNA, die, nachdem sie in den Wirt eingeschleust wurde, in DNA umgeschrieben wird. Das Enzym, das aus dem RNA-Genom eine DNA-Kopie herstellt, ist die **Reverse Transkriptase**. Das Enzym wird in der Molekularbiologie und in der Gentechnik häufig eingesetzt (s. Kap. 3). Ist die DNA-Kopie synthetisiert, wird sie mithilfe von zwei sich wiederholenden DNA-Sequenzen an den Enden, die man **lange terminale Sequenzwiederholungen** (engl. *long terminal repeats*, **LTRs**) nennt, in die Wirts-DNA integriert. Auf diese Weise wird das Retrovirus zum Bestandteil des Wirtsgenoms, weshalb AIDS (engl. *acquired immunodeficiency virus*) nicht völlig geheilt werden kann; der Wirt kann sich dieser retroviralen DNA, ist sie einmal integriert, niemals entledigen. Die viralen Gene dirigieren anschließend die Synthese von neuen Viruspartikeln, welche benachbarte Zellen infizieren. Die Reverse Transkriptase ist ein Beispiel für ein Genprodukt eines viralen Gens, das durch den Wirt synthetisiert



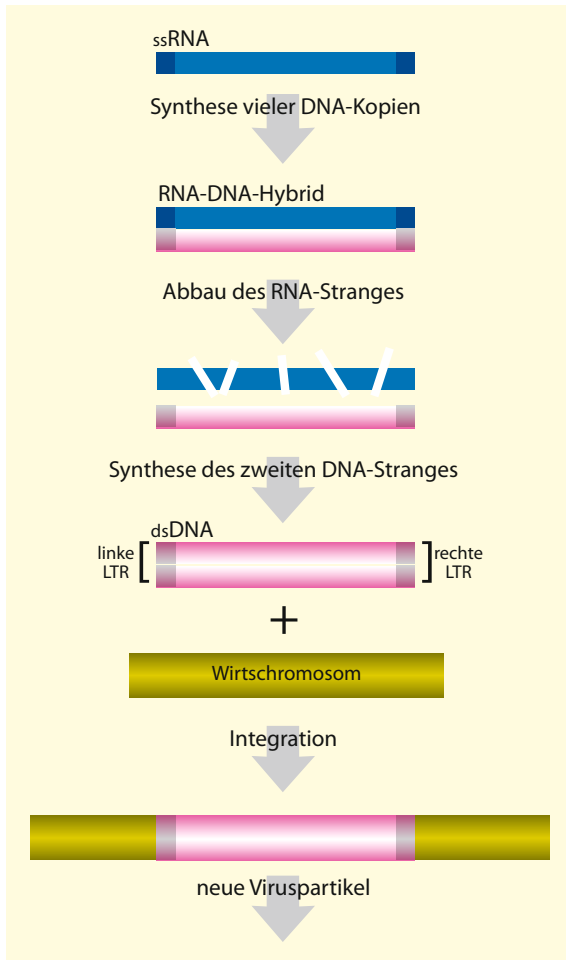
1.24 Beispiele für Viren

Viren haben unterschiedliche Formen und Größen, die bestimmen, ob das gesamte Virus oder nur sein Genom in die Wirtszelle eingeschleust wird.

und in Virionen verpackt wird, um den nächsten Infektionszyklus in Gang zu bringen.

Genome von Retroviren besitzen drei wichtige Gene, *gag*, *pol* und *env*, wie auch einige weniger bedeutsame Gene. Die Gene *tat* und *rev* regulieren die Expression der anderen viralen Gene. *Nef*, *vir*, *vpr* und *vpu* codieren vier Zugangsproteine, die die Immunabwehr der Wirtszelle hemmen und die Effizienz der Virusproduktion steigern. Von *gag*, *pol* und *env* ausgehend entstehen einzelne mRNA-Transkripte, die eine Vielzahl von Proteinen codieren.

Gag codiert drei Proteine, die an der Synthese des Capsids beteiligt sind. Bei *pol* sind es drei Proteine, von denen eines eine **Protease** ist, welche andere Proteine während des Zusammenbaus des Partikels abbaut. Eines ist eine Reverse Transkriptase, die eine DNA-Kopie des Genoms herstellt, und eines ist eine **Integrase**, die die virale DNA in das Wirtschromosom integriert. *Env* codiert zwei Strukturproteine: Eines von ihnen bildet die äußeren Schwanzfasern (Spikes) und eines unterstützt das Virus beim Eindringen in die Wirtszelle.



1.25 Lebenszyklus eines Retrovirus

Genome von Retroviren bestehen aus positiver RNA. Nachdem die RNA in die Wirtszelle eingeschleust wurde, wird mithilfe der Reversen Transkriptase von dem Genom eine DNA-Kopie synthetisiert. Der ursprüngliche RNA-Strang wird abgebaut und durch DNA ersetzt. Anschließend kann die gesamte doppelsträngige DNA-Version des viralen Genoms in das Wirtsgenom eingebaut werden.

Viren werden in der biotechnologischen Forschung ausgiebig genutzt, weil sie darauf spezialisiert sind, ihr Genom in das Wirtsgenom einzubauen. Sie nutzen den Wirt bei der Expression ihrer Gene und stellen weitere Kopien ihrer selbst her. Forscher machen sich diese Eigenschaften zunutze, um neue Gene zu untersuchen, die Genome anderer Modellorganismen zu verändern und beim Menschen Gentherapien durchzuführen.

Subvirale, infektiöse Agenzien und „genetische Einheiten“

Wir verwenden im Folgenden den Begriff „**genetische Einheiten**“, die gelegentlich auch als subvirale, infektiöse Agenzien bezeichnet werden. Dabei handelt es sich nicht um lebende Organismen, denn keine von ihnen verfügt über einen eigenen Energiestoffwechsel, repliziert das eigene Genom selbst oder kann unabhängig von einem Wirt überdauern. Im Gegensatz zu einer „genetischen Einheit“ hat ein Virus den großen Vorteil, in Form eines inaktiven Partikels außerhalb der Wirtszelle existieren zu können.

Bei **Satellitenviren** handelt es sich um defekte Viren. Sie vermögen ihr Genom zu replizieren oder es in ein Capsid zu verpacken, doch können sie nicht beides. Satellitenviren benötigen ein **Helfervirus**, das die fehlenden Komponenten bereitstellt. Das Hepatitisdeltavirus (HDV) ist ein kleines Satellitenvirus mit einzelsträngiger RNA, das die Leber infiziert. Es wird vom Hepatitis-B-Virus unterstützt. Der Bakteriophage P4 ist ein Satellitenvirus, das *E. coli* infiziert. Es ist ein Virus mit doppelsträngiger DNA, das als Plasmid repliziert oder in das Wirtschromosom integriert werden kann – es kann selbst keine Viruspartikel bilden. Es ist auf den P2-Bakteriophagen angewiesen, der die Strukturproteine liefert. P4 stellt für das P2-Genom Transkriptionsfaktoren bereit, die die Genexpression kontrollieren.

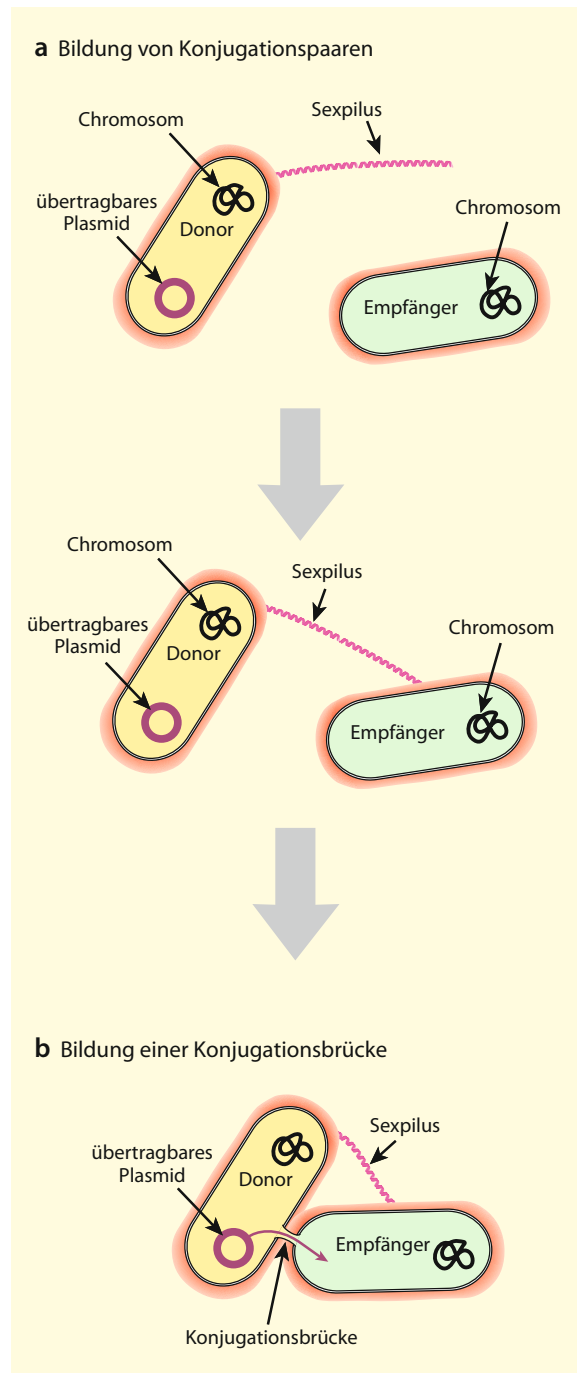
Auch „genetische Einheiten“, die für den Wirt nützlich sein können, gehören in diese Kategorie. So sind z.B. auch die Plasmide von *E. coli* und Hefe genetische Elemente, die über keinen eigenen Energiestoffwechsel verfügen und die für die eigene Replikation auf die Wirtszelle angewiesen sind. Sie können außerhalb der Zelle nicht existieren. Wie Viren und Satellitenviren sind Plasmide **Replikons**, d.h., sie tragen ausreichend Information in ihrem Genom, um ihre eigene Replikation zu dirigieren. Plasmide können für den Wirt positive Eigenschaften vermitteln. So kann ein Plasmid z.B. antibakteriell wirkende Enzyme codieren wie Bacteriocine, die es ihrem Wirt erlauben, mit anderen Bakterien um Nährstoffe zu konkurrieren (s. oben). Plasmide können Resistenzgene für Antibiotika tragen, sie ermöglichen es ihrem Wirt, in Anwesenheit dieser Antibiotika zu überleben. Plasmide verleihen auch Virulenz und machen das Wirtsbakterium aggressiver und auch tödlich. Schließlich enthalten manche Plasmide auch Gene,

durch die der Wirt neue Kohlenstoffquellen als Nahrungsquellen zu erschließen vermag.

Plasmide sind in der Regel kleine DNA-Ringe, obwohl es auch einige lineare Formen gibt. Trotz ihrer unterschiedlichen Größe sind sie gewöhnlich viel kleiner als das Bakterienchromosom. Die Gene auf den Plasmiden sind sehr oft für den Wirt vorteilhaft. Weil das Plasmid im Cytoplasma des Wirtes coexistiert, schädigt es seinen Wirt im Allgemeinen nicht.

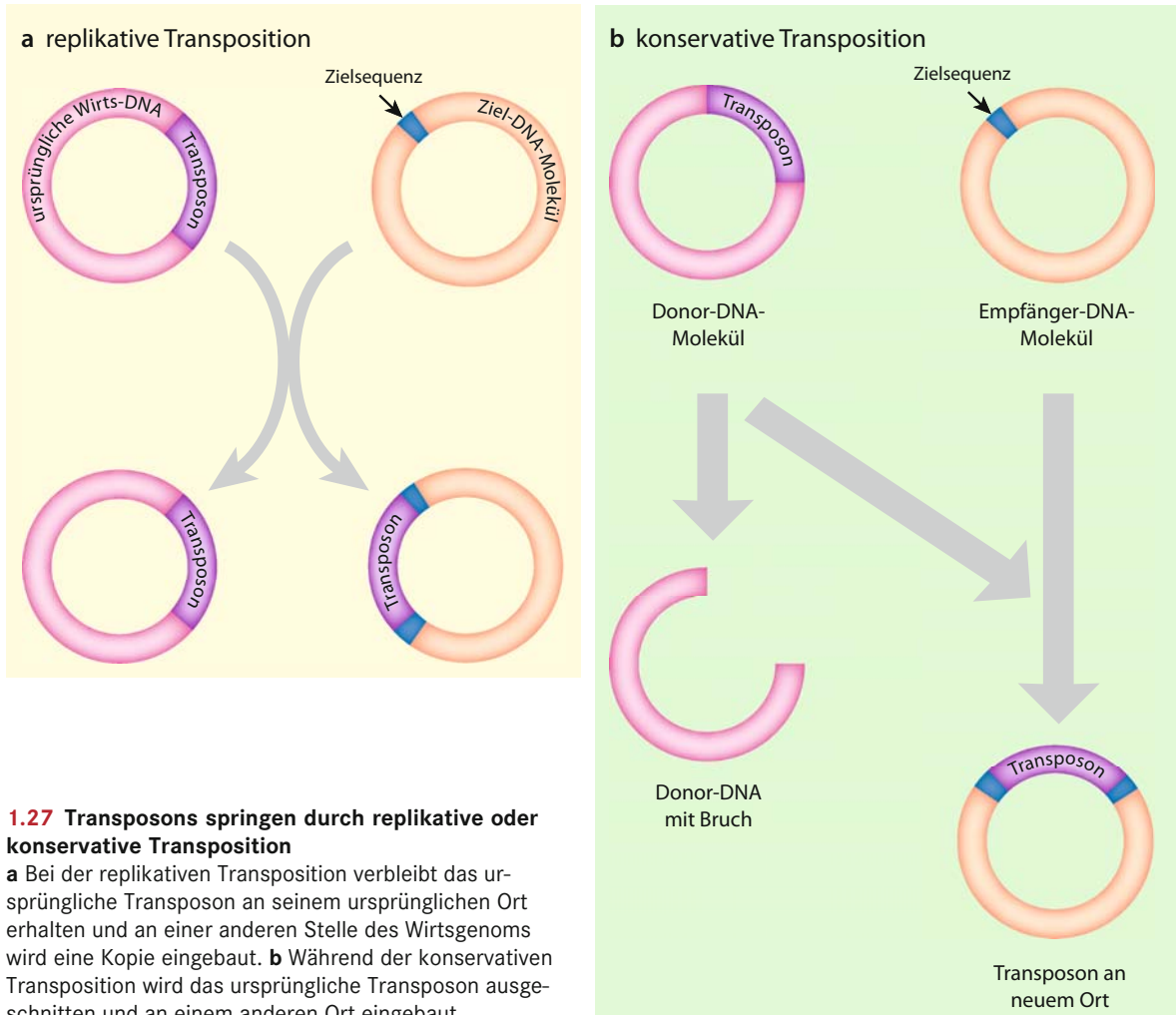
In einigen *E. coli*-Bakterien kommt das F-Plasmid vor, dessen Größe etwa 1 % der Größe des Chromosoms ausmacht. „F“ steht für Fertilität, und das Plasmid verleiht den Zellen die Fähigkeit, sich zu kreuzen. F-Plasmide können sich selbst von einer Zelle auf eine andere übertragen – ein Prozess, der als **Konjugation** bezeichnet wird (Abb. 1.26). Das Plasmid trägt Gene, die für die Ausbildung eines speziellen Pilus, den F-Pilus, verantwortlich sind, der eine F⁺-Zelle physisch mit einer F⁻-Zelle verbindet. Nach dem Kontakt bildet sich zwischen den beiden Zellen eine Konjugationsbrücke. Bei der Replikation des F-Plasmids wird ein DNA-Strang am Replikationsursprung gespalten, und das freie Ende tritt durch die Brücke in das Cytoplasma der F⁻-Zelle. Im Empfänger wird ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert, und das Plasmid wird wieder zu einem Ring geschlossen. Der andere Strang des elterlichen Plasmids verbleibt in der ursprünglichen F⁺-Zelle und wird ebenfalls dupliziert. Nach der Konjugation sind daher beide Zellen F⁺-Zellen. Gelegentlich integriert sich ein F-Plasmid aber auch in das Wirtschromosom. Wird ein solches eingebautes F-Plasmid mithilfe der Konjugation auf eine andere Zelle übertragen, dann können Teile des Wirtschromosoms ebenfalls übertragen werden. Auf diese Weise können Bakterien die in der chromosomalen DNA codierte genetische Information austauschen.

Weitere, für die Biotechnologie nützliche „genetische Einheiten“ sind die **transponierbaren Elemente** oder **Transposons**. Diese genetischen Elemente sind ein Stück DNA, das als unabhängiges Molekül nicht existieren und sich nicht replizieren kann. Um zu „überleben“ integriert es sich in ein anderes DNA-Molekül. **Mobile DNA** oder **springende Gene** sind ebenfalls zwei Begriffe, die Transposons beschreiben. Springt ein Transposon von einem Ort zu einem anderen, handelt es sich um eine **Transposition**. Im Gegensatz zu Plasmiden fehlt Transposons ein Replikationsursprung, es handelt sich nicht um Replikons. Sie können nur repliziert werden, wenn sie in ein Wirtschromosom, ein -plasmid oder in ein virales Genom integriert sind. Transposons springen innerhalb desselben Wirtsmoleküls von einem Ort zum



1.26 Konjugation bei *E. coli*

Bakterien mit einem übertragbarem Plasmid vermögen einen Sexpilus zu bilden, der sich an eine Empfängerzelle heftet. Wenn sich die beiden Zellen berühren entsteht eine Konjugationsbrücke, und eine Kopie des Plasmids wird von einer Zelle auf die andere übertragen. Ist das Plasmid in das Genom der Donorzelle eingebaut, können auch Segmente genomischer DNA übertragen werden.



1.27 Transposons springen durch replikative oder konservative Transposition

a Bei der replikativen Transposition verbleibt das ursprüngliche Transposon an seinem ursprünglichen Ort erhalten und an einer anderen Stelle des Wirtsgenoms wird eine Kopie eingebaut. **b** Während der konservativen Transposition wird das ursprüngliche Transposon ausgeschnitten und an einem anderen Ort eingebaut.

anderen, oder sie springen zwischen zwei Molekülen. Verliert ein Transposon die Fähigkeit zum Ortswechsel, verbleibt seine DNA an der Stelle im Chromosom oder einem anderen DNA-Molekül. Ein Großteil der „junk DNA“ im Menschen besteht, wie in Kapitel 8 besprochen wird, aus solchen Fragmenten.

Es gibt unterschiedliche Typen von Transposons, die sich nach dem Mechanismus ihrer Transposition unterteilen lassen. Transposons besitzen zwei umgekehrte DNA-Sequenzwiederholungen, jede an einem Ende. Sie verfügen außerdem über ein Gen, das die **Transposase** codiert, also das Enzym, welches für das Springen notwendig ist. Die Transposase erkennt die umgekehrten Sequenzwiederholungen an den Enden des Transposons und schneidet das Element vollständig aus dem Chromosom. Anschließend erkennt das Enzym die **Zielsequenz** mit einer Länge zwischen

drei und neun Basenpaaren in der Wirts-DNA. Das Transposon wird nun in die Zielsequenz eingebaut, die bei diesem Prozess verdoppelt wird. Auf jeder Seite des Transposons befindet sich eine Kopie. Wird das Transposon vollständig aus der DNA entfernt und springt es an einen anderen Ort, dann bezeichnet man den Mechanismus als **konservative Transposition** oder **cut and paste-Transposition** (Abb. 1.27). Zurück bleibt ein Doppelstrangbruch, der von der Wirtszelle repariert werden muss.

Ein alternativer Mechanismus ist die **replikative Transposition**, bei der eine zweite Kopie des Transposons entsteht. Mithilfe dieses Mechanismus bewegen sich **komplexe Transposons**. Wie zuvor beschrieben, erkennt die Transposase die umgekehrten Sequenzwiederholungen des Transposons. In diesem Fall führt das Enzym jeweils an einem Ende

einen Einzelstrangbruch in die DNA ein. Jeder der einzelnen DNA-Stränge des Transposons wird an der Zielstelle mit einem Strang der Wirts-DNA verbunden. Durch diesen Mechanismus entstehen zwei einzelsträngige Kopien des Transposons. Der Wirt reagiert auf solche einzelsträngigen DNA-Bereiche mit der Synthese des zweiten komplementären DNA-Stranges. Es entstehen schließlich zwei Kopien des Transposons. Es ist zu beachten, dass sich das Transposon nicht selbst repliziert, sondern den Wirt nutzt, um sich zu verdoppeln.

Das Springen von Transposons kann beim Wirt Komplikationen hervorrufen. Die Bewegung eines Transposons hat das Potenzial, Insertionen, Deletionen und Inversionen in der Wirts-DNA herbeizuführen. Befinden sich zwei Kopien eines Transposons auf einem Plasmid und liegt die Zielsequenz auf dem Wirtschromosom, dann kann ein Plasmidsegment (das von den Transposons flankiert wird) in die Wirts-DNA integriert werden. Allgemeiner betrachtet bedeutet das: Wenn viele Transposons nahe beieinander liegen, können die Enden von zwei benachbarten, jedoch getrennten Transposons für die Transposition verwendet werden. Springen diese Enden an eine neue Position, wird die DNA zwischen ihnen ebenfalls übertragen. Ganze Gene oder Genfragmente können dabei aus der ursprünglichen Position entfernt werden – umgekehrt werden manche Regionen eines Chromosoms auch dupliziert. Sind Transposons aktiv und springen häufig, wird das Genom stark geschädigt und die Wirtszellen begehen oftmals Selbstmord (s. Kap. 20). Weil das Transposon in einem solchen Fall zusammen mit der Wirtszelle zerstört wird, bewegen sich die meisten Transposons nur selten. Der kontrollierte Ortswechsel der Transposons bewahrt ihre Existenz im Genom und verhindert den Selbstmord der Zelle.

„Genetische Einheiten“ existieren innerhalb einer Wirtszelle, jedoch außerhalb von deren Genom. Einige „genetische Einheiten“ sind Satellitenviren, Plasmide und Transposons.

Das Plasmid ist eine einzigartige „genetische Einheit“, weil es positive Eigenschaften wie Resistenz gegenüber Antibiotika, Bacteriocinsynthese und das Vermögen, genetisches Material zwischen zwei Zellen auszutauschen, vermittelt.

Transposons enthalten im Gegensatz zu Plasmiden keinen Replikationsursprung für eine unabhängige Replikation. Diese Elemente nutzen die Zelle, um Kopien von sich herzustellen, indem sie im Genom Brüche einführen.

► Weiterführende Literatur

- Altun ZF, Hall DH (2002–2006) WormAtlas: <http://www.wormatlas.org>
- Clark DP (2005) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Garcia-Hernandez M, Berardini TZ, Chen G, Crist D, Doyle A, Huala E, Knee E, Lambrecht M, Miller N, Mueller LA, Mundodi S, Reiser L, Rhee SY, Scholl R, Tacklind, J, Weems DC, Wu Y, Xu I, Yoo D, Yoon J, Zhang P (2002) TAIR: A resource for integrated *Arabidopsis* data. *Funct Integrative Genomics* 2(6): 239
- Lynn DE (2002) Methods for maintaining insect cell cultures. *J Insect Sci* 2.9. Online verfügbar: <http://insect-science.org/2.9>
- McCarroll L, King LA (1997) Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol* 8: 590–594
- Renneberg R (2009) *Biotechnologie für Einsteiger*, 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Sprague J, Bayraktaroglu L, Clements D, Conlin T, Fashena D, Frazer K, Haendel M, Howe D, Mani P, Ramachandran S, Schaper K, Segerdell E, Song P, Sprunger B, Taylor S, Van Slyke C, Westerfield M (2006) The Zebrafish Information Network: The zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Res* 34: D581–D585

DNA, RNA und Protein

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie

Genexpression durch Transkription

RNA-Synthese

Stoppsignale für die Transkription

Die Anzahl der Gene auf einer mRNA ist unterschiedlich

Die eukaryotische Transkription ist komplexer

Die Regulation der Transkription in Prokaryoten

Prokaryotische σ -Faktoren regulieren die Genexpression

Das Lactoseoperon wird spezifisch und zugleich allgemein aktiviert

Die Regulation von Aktivatoren und Regulatoren

Die Regulation der Transkription in Eukaryoten

Eukaryotische Enhancer-Proteine für die Transkription

Die DNA-Struktur beeinflusst den Zugang von Proteinen zum Promotor

Eukaryotische mRNA wird vor der Proteinsynthese prozessiert

Die Übersetzung des genetischen Codes in Proteine

Der genetische Code wird in Form von Tripletts oder Codons gelesen

Die Proteinsynthese findet am Ribosom statt

Unterschiede zwischen pro- und eukaryotischer Translation

Mitochondrien und Chloroplasten synthetisieren ihre eigenen Proteine

Weiterführende Literatur

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie

Zwei wichtige Eigenschaften von lebenden Organismen sind die Reproduktion ihres eigenen Genoms und ein eigener Energiestoffwechsel. Um dieses bewerkstelligen zu können, muss ein Organismus auf der Basis der in seiner DNA codierten Information selbst Proteine synthetisieren. Proteine sind für den Aufbau der Zelle, die ihr die Gestalt und die Struktur verleihen, essenziell. Zu den Proteinen zählen auch Enzyme, die Reaktionen des Energiestoffwechsels katalysieren, und sie regulieren zelluläre Prozesse wie die Replikation. Proteine bilden membrandurchspannende Kanäle und stellen so die Kommunikation und den Austausch von Stoffwechselmetaboliten zwischen den Zellen sicher. Die Proteinsynthese ist einer der wichtigsten Prozesse in allen lebenden Organismen.

Das **zentrale Dogma** der Molekularbiologie besagt, dass die Information von der DNA über die RNA zum Protein fließt (Abb. 2.1). In diesem Kapitel konzentrieren wir uns zunächst darauf, wie in einem Prozess, den man als **Transkription** bezeichnet, ausgehend von der DNA RNA entsteht. Anschließend werden die Mechanismen besprochen, die die Transkription regulieren. Als nächstes betrachten wir, wie aus **mRNA** oder **Messenger-RNA** durch **Translation** Protein entsteht. Diese Beschreibungen sollen auch ein Gefühl für die Komplexität vermitteln, die sich ebenfalls auf die gentechnische Veränderung von Zellen für biotechnologische Zwecke auswirkt.

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie besagt, dass DNA in RNA transkribiert und diese anschließend in Protein translatiert wird.

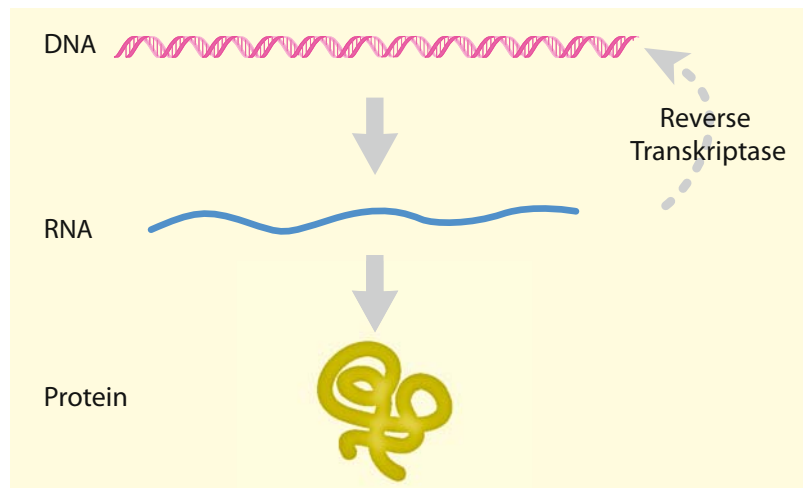
Genexpression durch Transkription

Als Genexpression bezeichnet man die Herstellung einer RNA-Kopie, ausgehend von der in der DNA vorhandenen Information, durch Transkription der DNA. Zur Transkription gehören das Entwinden der DNA, indem die Stränge am Beginn eines Gens aufgeschmolzen werden, die Synthese eines RNA-Moleküls, dessen Sequenz komplementär zum **Matriizenstrang** der DNA ist (katalysiert durch das Enzym **RNA-Polymerase**) und das Beenden der Synthese am Ende des Gens. Die neu synthetisierte RNA löst sich von der DNA, die wieder ihre superspiralisierte Form annimmt.

Ein wichtiger Aspekt bei der Transkription ist das Erkennen des richtigen Gens. Welches Gen muss in Protein translatiert werden? Es gibt unterschiedliche Typen von Genen. Einige sind sogenannte **Haushaltsgene**, die ständig benötigte Proteine codieren. Andere Gene werden nur unter bestimmten Umständen aktiviert. So werden z.B. in *E. coli* Gene, die an der Verwertung von Lactose beteiligte Proteine codieren, nur exprimiert, wenn Lactose auch tatsächlich vorhanden ist (s. unten). Das gleiche gilt für Gene, die für die Nutzung anderer Nährstoffe

2.1 Das zentrale Dogma

Zellen speichern die genetische Information für ihre Funktion und ihre Vermehrung in der DNA. Wird ein Protein benötigt, wird die DNA in RNA transkribiert und diese anschließend in ein Protein translatiert.



von Bedeutung sind. Verschiedene Induktoren und Hilfsproteine regulieren, ob diese Gene **exprimiert** und in RNA transkribiert werden; sie werden in den folgenden Abschnitten besprochen.

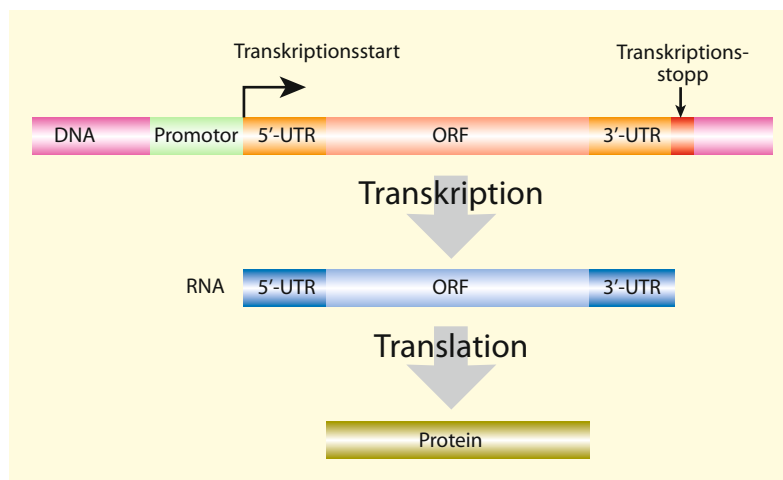
Das von einem Gen codierte Endprodukt ist häufig ein Protein, es kann sich aber auch um eine RNA handeln, wobei proteincodierende Gene zunächst in mRNA transkribiert und anschließend in ein Protein translatiert werden. Andere RNA-Moleküle wie tRNA, rRNA und snRNA werden dagegen direkt verwendet. Einige RNA-Moleküle wie die rRNA der großen ribosomalen Untereinheit bezeichnet man als **Ribozyme**, denn sie katalysieren enzymatische Reaktionen (s. Kap. 5). Am häufigsten jedoch codieren Gene über ein RNA-Zwischenprodukt ein Protein. Der codierende Bereich eines Gens wird manchmal als **Cistron** oder **Strukturgen** bezeichnet und kann die Information für ein Protein oder eine nichttranslatierte RNA tragen. (Die Bezeichnung „Cistron“ wurde ursprünglich durch eine Komplementierung im *cis/trans*-Test definiert.) Ein **offenes Leseraster** (engl. *open reading frame*, **ORF**) ist dagegen ein Stück DNA (oder die entsprechende RNA), welches ein Protein codiert und daher nicht durch Stoppcodons für die Translation unterbrochen wird (s. unten).

Entscheidend ist auch, den Startpunkt eines Gens zu finden. Jedes Gen verfügt über einen Bereich, der stromaufwärts von der codierenden Sequenz liegt und als **Promotor** bezeichnet wird (Abb. 2.2). Die RNA-Polymerase erkennt diesen Bereich und beginnt an dieser Stelle mit der Transkription. Bakterielle Promotoren besitzen zwei Haupterkennungsstellen: die -10- und die -35-Region. Die Zahlen beziehen sich auf ihre ungefähre Position stromaufwärts der Startstelle für

die Transkription. (Die Konvention legt fest, dass positive Zahlen Nucleotide stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt bezeichnen und negative stromaufwärts gelegene.) Die genauen Nucleotidsequenzen bei -10 und -35 variieren zwar, doch die Consensussequenzen sind TATAA bzw. TTGACA. Wird ein Gen ständig (**konstitutiv**) transkribiert, dann stimmt die Sequenz des Promotors sehr gut mit der Consensussequenz überein. Wird ein Gen nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert, dann sind **Aktivatorproteine** oder **Transkriptionsfaktoren** notwendig, die an die Promotorregion binden, damit die RNA-Polymerase diesen Bereich erkennen kann. Solche Promotoren haben nur geringe Ähnlichkeit mit der Consensussequenz.

Direkt an die Promotorregion grenzt die Stelle für den **Transkriptionsstart**. Dort beginnt die RNA-Polymerase mit der Verknüpfung von Nucleotiden. Zwischen dem Transkriptionsstart und dem ORF befindet sich ein Bereich, der als **5'-nichttranslatierte Region** (engl. *5' untranslated region*, **5'-UTR**) bezeichnet und nicht in Protein translatiert wird. Diese Region enthält regulatorische Elemente für die Translation wie die Ribosomenbindungsstelle. Als nächstes folgt der ORF, der kein Signal für einen Translationsstopp enthält. Hinter dem ORF gibt es einen weiteren nichttranslatierten Bereich, die **3'-nichttranslatierte Region** (**3'-UTR**), und schließlich folgt die Terminationssequenz, an der die Transkription endet.

Bakterielle RNA-Polymerasen bestehen aus unterschiedlichen Proteinuntereinheiten. Die **σ -Untereinheit** erkennt die -10- und die -35-Region, und das **Core-Enzym** katalysiert die RNA-Synthese und verknüpft die Nucleotide in 5'→3'-Richtung. Das Core-Enzym hat vier Proteinuntereinheiten, ein Di-



2.2 Struktur eines typischen Gens

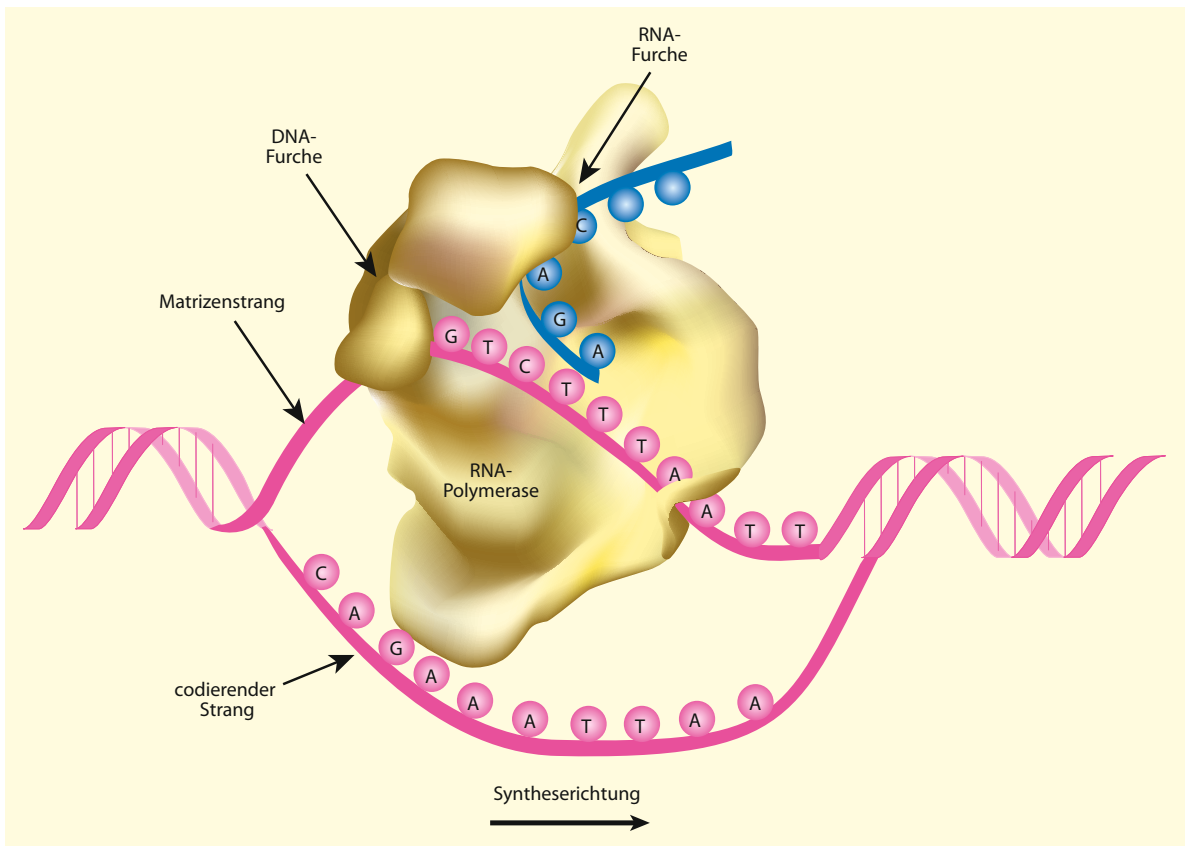
Gene sind DNA-Bereiche, die in RNA transkribiert werden. In den meisten Fällen wird die RNA in ein Protein translatiert, doch bei einigen RNAs ist dies nicht der Fall. Das Gen besitzt eine Promotorregion, eine Startstelle und ein Terminationssignal, die die codierende Sequenz flankieren. Die mRNA besitzt eine 5'-nichttranslatierte (5'-UTR) und eine 3'-nichttranslatierte Region (3'-UTR); nur der ORF wird in Protein translatiert.

mer aus zwei α -Untereinheiten, eine β - und eine ähnliche β' -Untereinheit. β und β' bilden das katalytische Zentrum, und die α -Untereinheit unterstützt die Erkennung des Promotors. Die dreidimensionale Struktur der RNA-Polymerase zeigt eine tiefe Furche, die die DNA-Matrize fixiert, und eine kleinere Furche, welche die wachsende RNA hält.

Für die Transkription besitzen Gene einen Promotor, an dem die RNA-Polymerase an die DNA bindet und ausgehend vom Matrizenstrang mit der Synthese der RNA-Kopie beginnt. Die RNA besteht aus drei Bereichen: Die 5'-UTR, die wichtige Informationen für die Proteinsynthese trägt, den ORF, der die tatsächlich codierende Sequenz umfasst, welche während der Translation in die Aminosäuresequenz des Proteins umgesetzt wird, und die 3'-UTR, die weitere wichtige regulatorische Elemente enthält.

RNA-Synthese

Hat die σ -Untereinheit der RNA-Polymerase in Bakterien die -10 - und die -35 -Region erkannt, bildet das Core-Enzym eine **Transkriptionsblase**, in der die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt werden (Abb. 2.3). Den Strang, den die RNA-Polymerase abliest, bezeichnet man als Matrizenstrang (auch als **nichtcodierender** oder **Antisense-Strang** bekannt); er ist komplementär zu der entstehenden mRNA. Das Core-Enzym fügt entsprechend der Sequenz auf dem DNA-Matrizenstrang Nucleotide in $5' \rightarrow 3'$ -Richtung aneinander. Die neu synthetisierte RNA lagert sich mithilfe von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren an den Matrizenstrang. Der gegenüberliegende DNA-Strang wird als **codierender Strang** (auch als **Nichtmatrizenstrang** oder **Sense-Strang** bekannt) bezeichnet. Weil er komplementär



2.3 Die RNA-Polymerase synthetisiert RNA in der Transkriptionsblase

Die RNA-Polymerase ist ein komplexes Enzym mit zwei Furchen. Die erste Furche hält die einzelsträngige DNA und die zweite fixiert die wachsende RNA. Das Enzym gleitet an der DNA entlang und fügt gleichzeitig Ribonucleotide an, die komplementär zu den Basen auf dem DNA-Matrizenstrang sind.

zum Matrizenstrang ist, ist seine Sequenz identisch mit der RNA (bis auf den Austausch von Thymin gegen Uracil in der RNA).

Die RNA-Synthese beginnt normalerweise bei einem Purin in der DNA (in der Regel ist es ein A), das von zwei Pyrimidinen flankiert wird. Die häufigste Startsequenz ist CAT, doch gelegentlich ist das A durch ein G ersetzt. Die Geschwindigkeit der Elongation ist etwa 40 Nucleotide pro Sekunde, was sehr viel weniger ist als bei der Replikation (etwa 1000 Basenpaare pro Sekunde). Die RNA-Polymerase entwindet die DNA, wenn sie den DNA-Strang entlang gleitet, ein Vorgang, der zu einer positiven Superspiralisierung führt. Hinter der RNA-Polymerase ist die DNA teilweise entwunden und hat eine zusätzliche negative Superspiralisierung. Genau wie während der Replikation fügen DNA-Gyrase und Topoisomerase I entweder Spiralisierungen ein bzw. entfernen sie. Dadurch kehrt die DNA in den Zustand ihrer normalen Superspiralisierung zurück (s. Kap. 4).

Die RNA-Polymerase stellt anhand des nichtcodierenden oder Matrizenstranges eine Kopie des Gens her. Die RNA enthält Uracil statt Thymin.

Stoppsignale für die Transkription

Die RNA-Polymerase setzt die Transkription der DNA fort, bis sie auf ein Terminationssignal trifft. In Bakterien handelt es sich hierbei um den **ρ -(rho)-unabhängigen Terminator**. Das ist eine Region auf der DNA, mit zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen, die ungefähr sechs Basen auseinander liegen, gefolgt von einer Reihe von Adeninresten. Wenn die RNA-Polymerase auf diese Sequenzen trifft, bilden die beiden umgekehrten Sequenzwiederholungen eine Haarnadelstruktur aus. Diese Sekundärstruktur veranlasst die RNA-Polymerase anzuhalten. Wenn die Reihe von Adeninresten in eine Folge von Uracilmolekülen transkribiert wird, wird das DNA/RNA-Hybrid instabil (A/U-Basenpaare bilden nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus). Die RNA-Polymerase beginnt zu „stottern“ und fällt, wenn sie etwa die Mitte der Folge von Adeninresten erreicht hat, vom DNA-Matrizenstrang ab.

Bakterien verfügen auch über **ρ -abhängige Terminatoren**, die zwar die beiden umgekehrten Sequenzwiederholungen haben, denen jedoch die Folge aus

Adeninresten fehlt. Das **ρ -Protein** ist eine spezifische Helikase, die die Doppelhelix des DNA/RNA-Hybrids entwindet. Das Protein bindet stromaufwärts von der Terminationsstelle in einer cytosinreichen aber guaninarmen Region. Nachdem die RNA-Polymerase diese Bindungsstelle für ρ passiert hat, heftet sich das Protein an die RNA und gleitet entlang des RNA-Transkriptes, bis es an der Haarnadelstruktur zur RNA-Polymerase aufgeschlossen hat. Das ρ -Protein entwindet anschließend die DNA/RNA-Helix, trennt die beiden Stränge, und die RNA wird freigesetzt.

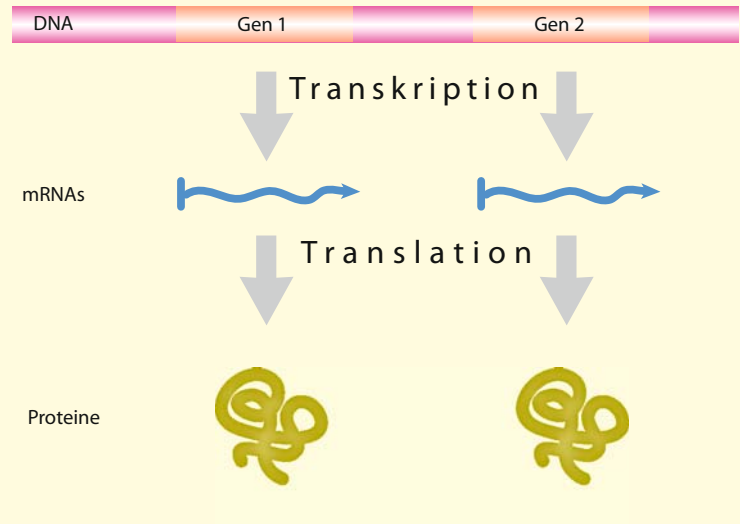
Die Transkription endet entweder unabhängig oder abhängig vom ρ -Protein.

Die Anzahl der Gene auf einer mRNA ist unterschiedlich

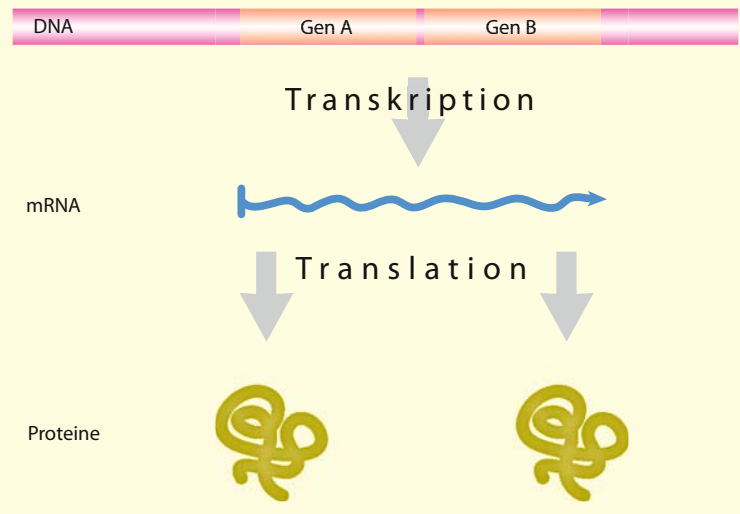
Bakterielle und eukaryotische Chromosomen sind sehr unterschiedlich aufgebaut. In Prokaryoten ist der Abstand zwischen Genen viel geringer, und die Gene, deren Produkte mit einem Stoffwechselweg assoziiert sind, befinden sich häufig in enger Nachbarschaft. So enthält z.B. das Lactoseoperon etliche zu einem Cluster zusammengefasste Gene des Lactosestoffwechsels. **Operons** sind Gencluster, die einen Promotor besitzen und zu einer einzelnen langen mRNA transkribiert werden, die viele Strukturgene oder Cistrons enthält. Diese Transkripte werden daher auch als **polycistronische mRNAs** bezeichnet (Abb. 2.4). Die Cistrons werden einzeln translatiert, sodass voneinander getrennte Proteine entstehen. Bei Eukaryoten sind die Gene häufig durch lange DNA-Bereiche getrennt, die kein Protein codieren. Außerdem hat jede mRNA nur ein Cistron und wird daher **monocistronische mRNA** genannt. Wird ein polycistronisches Transkript in Eukaryoten exprimiert, dann translatiert das Ribosom lediglich das erste Cistron, während die anderen codierten Proteine nicht synthetisiert werden.

Bakterielle mRNA-Transkripte haben viele offene Leseraster für Proteine desselben Stoffwechselweges. In Eukaryoten befindet sich auf einem einzelnen mRNA-Transkript dagegen nur ein offenes Leseraster.

Eukaryot



Prokaryot



2.4 Monocistronisch versus polycistronisch

In Eukaryoten sind Gene einzelne Einheiten und werden als solche in einzelne mRNAs transkribiert, wobei jede mRNA nur ein Protein codiert. In Prokaryoten liegen Gene in Operons vor. Jedes Operon wird als einzelne mRNA transkribiert, die dann in einzelne Proteine translatiert wird.

Die eukaryotische Transkription ist komplexer

Zahlreiche Unterschiede zwischen eukaryotischer und prokaryotischer Transkription beruhen auf der höheren Komplexität eukaryotischer Zellen. Die einfache Tatsache, dass eukaryotische mRNA im Zell-

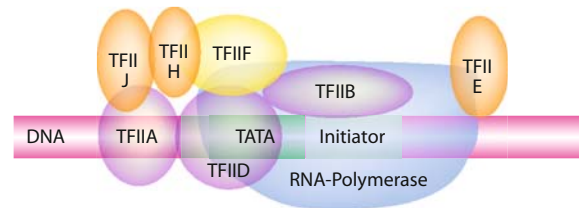
kern synthetisiert wird, macht den Prozess komplizierter als die bakterielle Transkription, doch dieses ist nur einer der Unterschiede.

Im Vergleich zu einer einzigen RNA-Polymerase in Prokaryoten besitzen Eukaryoten drei dieser Enzyme, von denen jedes verschiedene Gentyten transkribiert. Die **RNA-Polymerase I** transkribiert eukaryotische Gene für die RNA der großen ribo-

somalen Untereinheit. Diese beiden rRNAs werden in Form einer langen RNA transkribiert und diese anschließend in zwei unterschiedliche Transkripte gespalten, die 18S-rRNA und die 28S-rRNA. Sie werden direkt verwendet und nicht in Protein translatiert. Die **RNA-Polymerase III** transkribiert die Gene für die tRNA, 5S-rRNA und andere kleine RNA-Moleküle. Die **RNA-Polymerase II** transkribiert proteincodierende Gene und ist bislang am besten untersucht.

Der Transkriptionsstart bei eukaryotischen Genen ist weitaus komplexer als der von prokaryotischen, und der eukaryotische Promotor ist vollkommen anders aufgebaut. Die RNA-Polymerase II erfordert drei verschiedene Bereiche, die **Initiatorregion**, die **TATA-Box** und verschiedene, stromaufwärts liegende Elemente, an die Proteine (Transkriptionsfaktoren) binden. Die Initiatorregion ist der Bereich, an dem die Transkription beginnt, er liegt ungefähr 25 Basenpaare von der TATA-Box entfernt. Die stromaufwärts liegenden Elemente sind von Gen zu Gen unterschiedlich, sie sind Teil der Regulation, die bestimmt, welche Gene zu welcher Zeit exprimiert werden.

Viele Proteine sind daran beteiligt, die eukaryotische RNA-Polymerase II am Transkriptionsstartpunkt zu positionieren (Abb. 2.5 und Tab. 2.1). Damit die RNA-Polymerase II mit der Transkription beginnen kann, sind viele **allgemeine Transkriptionsfaktoren** notwendig. Zusätzlich gibt es, abhängig vom jeweiligen Gen, **spezifische Transkriptionsfaktoren** (s. unten). Der **TATA-bindende Faktor** oder **TATA-Box-Faktor** (TBF) erkennt die TATA-Box und wird von allen drei eukaryotischen RNA-Polymerasen verwendet. Bei der RNA-Polymerase II bildet TBF mit anderen Proteinen einen Komplex, der als **TFIID** bezeichnet wird. (Bei den anderen RNA-Polymerasen ist TBF mit anderen Proteinen assoziiert.) Nachdem dieser Komplex gebunden hat, treten **TFIIA** und **TFIIB** hinzu und binden an den Promotor, wodurch anschließend die Bindung der RNA-Polymerase II an den Promotor eingeleitet wird. Das Enzym ist bereits mit **TFIIF** assoziiert, das vermutlich die Bindung an den Promotor unterstützt. Nach der Bindung der RNA-Polymerase sind **TFIIE**, **TFIIH** und **TFIIF** für die Initiation der Transkription notwendig. **TFIIH** phosphoryliert die RNA-Polymerase II an einem Ende und das Enzym beginnt an der DNA entlangzuziehen. Wenn die RNA-Polymerase II den Promotor verlässt, lässt sie den gesamten Komplex zurück, außer **TFIIH**.



2.5 Eukaryotische Transkription

Viele unterschiedliche Transkriptionsfaktoren unterstützen die RNA-Polymerase II bei der Suche nach der TATA-Box und der Initiatorregion in einem eukaryotischen Promotor.

Tabelle 2.1 Allgemeine Transkriptionsfaktoren für die RNA-Polymerase II

TBF	bindet an TATA-Box, Teil von TFIID
TFIID	enthält TBP, erkennt Pol II-spezifischen Promotor
TFIIA	bindet stromaufwärts der TATA-Box; notwendig für die Bindung der RNA-Pol II an den Promotor
TFIIB	bindet stromabwärts der TATA-Box; notwendig für die Bindung der RNA-Pol II an den Promotor
TFIIF	begleitet RNA-Pol II, wenn diese an den Promotor bindet
TFIIE	notwendig für das Verlassen des Promotors und die Elongation
TFIIH	phosphoryliert ein Ende der RNA-Pol II, bleibt während der Elongation an die RNA-Pol II gebunden
TFIIF	notwendig für das Verlassen des Promotors und die Elongation

Die bakterielle RNA-Polymerase ist an einem Promotor aktiv, der keine stromaufwärts liegenden Elemente besitzt. In Eukaryoten sind diese Regionen für die Funktion der RNA-Polymerase II unbedingt notwendig, und ein Promotor ohne sie ist bei der Initiation der Transkription sehr ineffizient. Die stromaufwärts liegenden Elemente haben eine Länge zwischen 50 und 200 Basenpaaren, abhängig von dem jeweiligen Gen. Sie sind die Bindungsstellen für regulatorische Proteine, die als spezifische Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Diese spezifischen Transkriptionsfaktoren unterscheiden sich von den allgemeinen Transkriptionsfaktoren dadurch, dass sie nicht an alle Promotoren binden, die von der RNA-

Polymerase II genutzt werden. So binden z.B. die spezifischen Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Oct-2 nur an das Oktamerelement. Oct-1 ist in allen Geweben vorhanden, Oct-2 dagegen nur in Zellen des Immunsystems. Es gibt eine Fülle von spezifischen Faktoren, deren Besprechung den Rahmen dieses Buches sprengen würde.

Eukaryoten besitzen drei verschiedene RNA-Polymerasen, die unterschiedliche Gene transkribieren. Die RNA-Polymerase II benötigt für die Transkription viele verschiedene Proteine.

In Eukaryoten sind für die Initiation der Transkription spezifische Transkriptionsfaktoren notwendig. Diese sind reichlich vorhanden und bei jedem Gen reguliert ein anderer Satz von Faktoren dessen Transkription.

Die Regulation der Transkription in Prokaryoten

In Prokaryoten reguliert eine Vielzahl von Aktivator- und **Repressorproteinen** welche Gene transkribiert werden. Aktivatoren und Repressoren binden an die DNA in der Promotorregion und stimulieren oder hemmen die Aktivität der bakteriellen RNA-Polymerase. In *E. coli* werden etwa 1000 der 4000 Gene gleichzeitig exprimiert. Aktivatorproteine wirken über **positive Regulation**; mit anderen Worten, Gene werden nur exprimiert, wenn der Aktivator ein positives Signal gibt. Repressoren wirken im Gegensatz dazu durch **negative Regulation**. Das Gen wird nur exprimiert, wenn der Repressor entfernt wird. Einige Repressoren verhindern, dass die RNA-Polymerase an die DNA bindet, andere verhindern die Initiation der Transkription, auch wenn die RNA-Polymerase bereits gebunden hat.

Die Regulation der Transkription ist auch in einfachen Prokaryoten komplex. Viele Gene werden durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert. Einige Bakterienoperons haben viele Repressoren und Aktivatoren. Seltener hemmen regulatorische Proteine die Elongation, indem sie deren Geschwindigkeit verringern oder vorzeitig die Termination signalisieren. Umgekehrt sind einige wenige **Antiterminatorproteine** bekannt, die zu einem Überlesen der Terminationsstelle führen, sodass stromabwärts von dieser Stelle liegende Gene exprimiert werden.

Prokaryoten nutzen sowohl die positive Regulation, bei der Aktivatorproteine der RNA-Polymerase die Transkription des Gens signalisieren, als auch die negative Regulation, bei der Transkriptionsfaktoren die RNA-Polymerase inhibieren.

Prokaryotische σ -Faktoren regulieren die Genexpression

Die prokaryotische RNA-Polymerase besitzt eine σ -Untereinheit, die zunächst den Promotor erkennt und dann die katalytische Untereinheit des Enzyms (das Core-Enzym) bindet. Es gibt viele verschiedene σ -Untereinheiten, und jede erkennt einen anderen Satz von Genen. Die σ^{70} -Untereinheit (RpoD) ist die am häufigsten verwendete Form. Sie erkennt die meisten Haushaltsgene von *E. coli*. Während der stationären Phase, wenn *E. coli* nur langsam wächst, aktiviert σ^{38} (RpoS) die entsprechenden Gene. (Die σ -Untereinheiten werden entweder durch ein σ mit Angabe der Molekülmasse oder durch Rpo [für RNA-Polymerase] mit der entsprechenden Funktion: D = engl. *default*, S = engl. *stationary* usw. bezeichnet.)

Ein weiterer σ -Faktor, RpoH, oder σ^{32} , aktiviert Gene, deren Produkte während der Hitzeschockreaktion benötigt werden. Normalerweise wächst *E. coli* bei einer Körpertemperatur von 37 °C und stellt das Wachstum über 43 °C ein. Bei solchen höheren Temperaturen beginnen die Proteine, sich zu entfalten und werden abgebaut. RpoH aktiviert die Expression von **Chaperoninen**, die die korrekte Faltung der Proteine unterstützen und deren Aggregation verhindern. RpoH aktiviert auch **Proteasen**, die zu stark geschädigte Proteine abbauen.

Transkription und Translation von RpoH hängen von der Temperatur ab. Wächst *E. coli* bei einer normalen Temperatur, dann sind nur wenige Proteine falsch gefaltet. DnaK (ein Chaperonin) und HflB (eine Protease) befinden sich im Cytoplasma und müssen nur wenige falsch gefaltete Proteine „fixieren“. Sie binden daher an RpoH und bauen das Protein und sogar nur teilweise translatiertes RpoH-Protein ab. Wenn höhere Temperaturen die Entfaltung und Aggregation von Proteinen fördern, dann binden DnaK und HflB an die geschädigten Proteine und zerstören nicht länger RpoH. Nun initiiert der σ -Faktor die Transkription von anderen Genen, die mit der Hitzeschockreaktion in Verbindung stehen.

σ -Untereinheiten sind Transkriptionsfaktoren, die mit der prokaryotischen RNA-Polymerase assoziiert sind. Sie kontrollieren, welche Gene transkribiert werden.

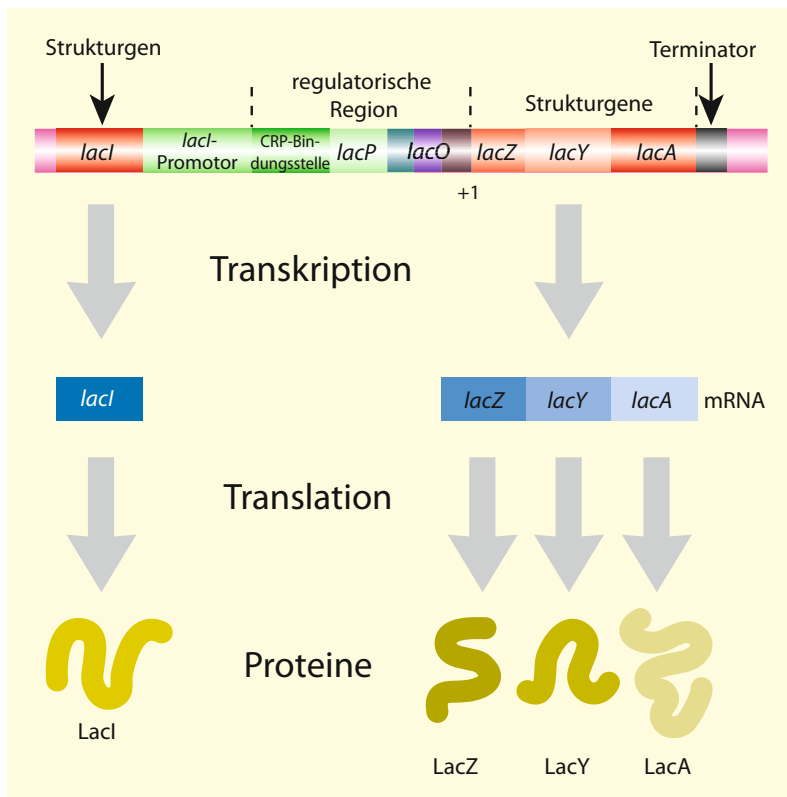
Das Lactoseoperon wird spezifisch und zugleich allgemein aktiviert

Viele Gene benötigen für die Aktivierung ihrer Transkription durch die RNA-Polymerase spezifische regulatorische Proteine. Einige dieser Proteine liegen in zwei Formen vor: einer aktiven (bindet im Bereich des Promotors an die DNA) und einer inaktiven (bindet nicht). Die Formen werden durch kleine **Signalmoleküle** oder **Induktoren**, die die Konformation des Proteins verändern, ineinander umgewandelt. So kontrolliert z.B. der Induktor Allolactose das Lactoseoperon.

Das Lactose- oder *lac*-Operon war das erste Operon, das man gefunden hat, und daher ist es sehr gut untersucht. Stromaufwärts der drei Strukturgene *lacZ*,

lacY und *lacA* liegt ein Promotor. Die *lacZYA*-Gene werden in eine polycistronische mRNA transkribiert. Stromaufwärts des Promotors befindet sich das Gen für das LacI-Protein, der Repressor des *lac*-Operons (Abb. 2.6). Das *lacZ*-Gen codiert die **β -Galactosidase**, die das Disaccharid Lactose in Galactose und Glucose spaltet. Das *lacY*-Gen codiert die **Lactose-Permease**, die Lactose durch die Plasmamembran in das Bakterium transportiert. Das *lacA*-Gen codiert schließlich die **Lactose-Acetylase**, deren Funktion nicht bekannt ist. Der Promotor besitzt eine Bindungsstelle (*lacO*) für das Repressorprotein, die mit der Bindungsstelle für die RNA-Polymerase überlappt. Dieser Bereich ist auch als **Operator** bekannt. Hat der Repressor gebunden, kann die RNA-Polymerase das Operon nicht transkribieren.

Außerdem existiert eine Bindungsstelle für das **CRP-Protein** (engl. *cyclic AMP receptor protein*), das auch als **CAP** (engl. *catabolite activator protein*; Kataboliten-Aktivatorprotein) bekannt ist. Es handelt sich hierbei um einen weit verbreiteten Regulator, der die Transkription vieler unterschiedlicher Operons für die Verwendung alternativer Zuckerquellen aktiviert. Es ist aktiv, wenn *E. coli* Glucose nicht als Energiequelle zur Verfügung steht.

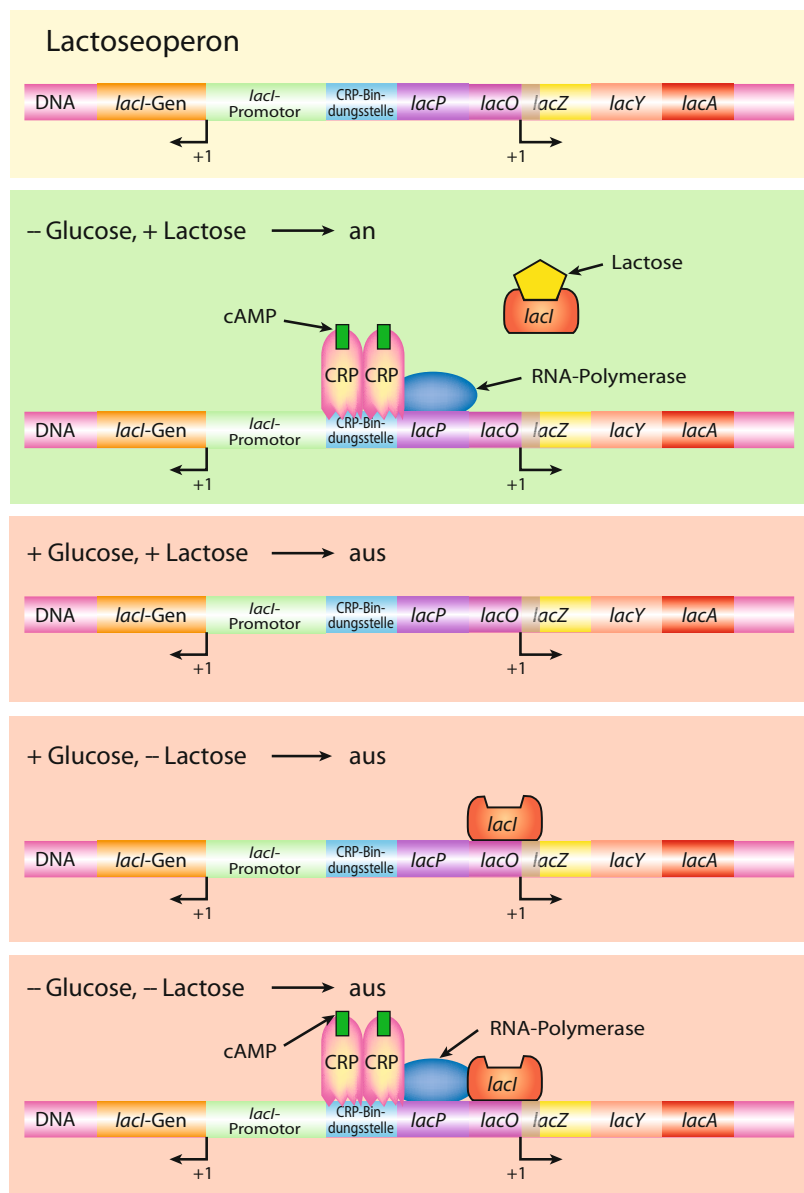


2.6 Komponenten des *lac*-Operons

Das *lac*-Operon besteht aus drei Strukturgenen, *lacZYA*, die von einem einzigen Promotor aus transkribiert werden, der als *lacP* bezeichnet wird. Der Promotor wird durch die Bindung des Repressors an den Operator (*lacO*) und des CRP-Proteins an die CRP-Bindungsstelle reguliert. In Wirklichkeit überlappt der Operator sowohl mit dem Promotor als auch mit dem *lacZ*-Gen. Die einzelne *lac*-mRNA wird translatiert, und es entstehen die Proteine LacZ, LacY und LacA. Das *lacI*-Gen codiert den LacI-Repressor. Es besitzt seinen eigenen Promotor und wird in die zum *lacZYA*-Operon entgegengesetzte Richtung transkribiert.

Die Umweltbedingungen bestimmen, ob das Lactoseoperon exprimiert wird oder nicht (Abb. 2.7). Steht *E. coli* viel Glucose zur Verfügung, dann wird das Lactoseoperon abgeschaltet (genauso wie andere Operons für andere Zucker wie Maltose oder Fructose). Ist Glucose vorhanden, dann ist die Konzentration des kleinen Induktors **cAMP** (zyklisches AMP) gering. Geht Glucose hingegen zuneige, steigt die cAMP-Konzentration an, das Molekül bindet an CRP, den allgemeinen Regulator. CRP dimerisiert anschließend, sodass es an die CRP-Bindungsstelle

in verschiedenen Promotoren wie im *lac*-Operon binden kann. Die Bindung von CRP alleine aktiviert das *lac*-Operon allerdings nicht; Lactose muss ebenfalls vorhanden sein, um die Transkription in Gang zu bringen. Ist Lactose verfügbar, dann katalysiert die β -Galactosidase eine Nebenreaktion und wandelt einige Lactosemoleküle in Allolactose um. Allolactose wirkt als Induktor und bindet an den tetrameren LacI-Repressor, der daraufhin den Promotor verlässt. Das Lactoseoperon wird nur exprimiert, wenn die Konzentration an Glucose niedrig und Lactose vor-



2.7 Regulation des Lactoseoperons

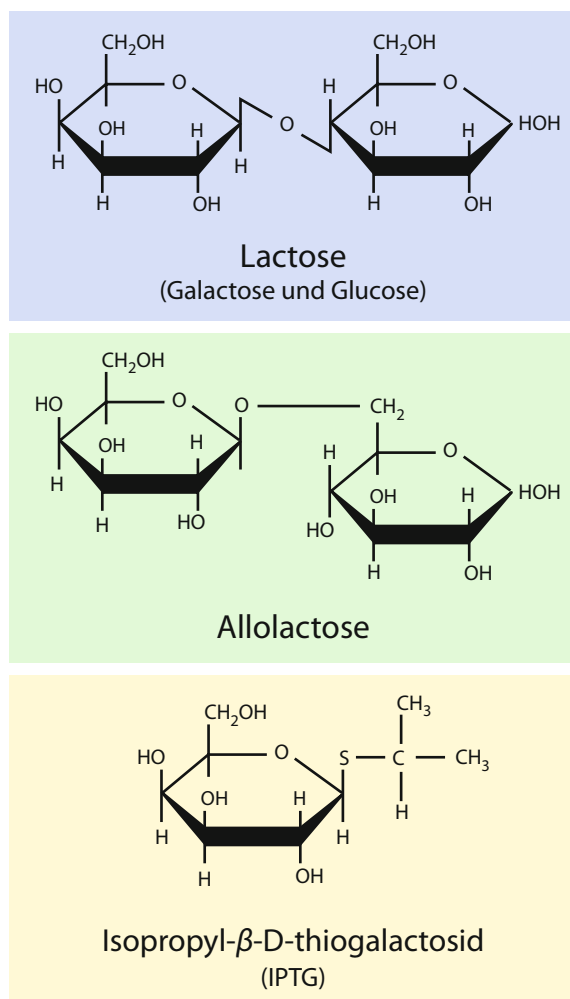
Das Lactoseoperon wird abgeschaltet, wenn Glucose fehlt und gleichzeitig Lactose vorhanden ist. Ist Glucose verfügbar, dann aktiviert das allgemeine Aktivatorprotein CRP die Bindung der RNA-Polymerase nicht. Fehlt Glucose, dann bindet CRP an den Promotor und stimuliert die Bindung des Enzyms. Bei einem Lactosemangel ist das LacI-Protein weiterhin an den Operator gebunden und verhindert eine Transkription des Operons durch die RNA-Polymerase. Nur wenn Lactose vorhanden ist, löst sich LacI von der DNA.

handen ist. Die Kontrolle beruht auf zwei Induktormolekülen: cAMP bindet an den allgemeinen Aktivator CRP und Allolactose bindet an den spezifischen Repressor LacI. Eine Kontrolle ist allgemein (CRP), weil sie viele verschiedene Operons beeinflusst, und die andere Kontrolle ist spezifisch (LacI), weil sie nur das Lactoseoperon betrifft.

Viele Forscher nutzen den Lactosepromotor, um die Expression anderer Gene zu kontrollieren. Im Labor wird allerdings nicht Allolactose für die Induktion des Promotors verwendet, sondern der **künstliche Induktor IPTG (Isopropylthiogalactosid; Abb. 2.8)**. IPTG wird durch die β -Galactosidase

nicht gespalten, weil die beiden Moleküle, aus denen es besteht, nicht durch ein Sauerstoffatom, sondern über ein Schwefelatom miteinander verbunden sind. Da IPTG nicht metabolisiert wird, muss es während eines Experiments nicht laufend zugegeben werden (wie es bei einem natürlichen Induktor nötig wäre).

Es ist wichtig das *lac*-Operon zu verstehen, denn seine Induktoren und Regulatoren werden für die Regulation der Expression neuer Gene in einem transgenen Modellorganismus verwendet.



2.8 Die Strukturen von Lactose, Allolactose und IPTG
IPTG ist ein nichtmetabolisierbares Analogon der Allolactose, dem Induktor des Lactoseoperons. Die β -Galactosidase kann die Schwefelbindung und daher auch das IPTG-Molekül nicht spalten.

Die Regulation von Aktivatoren und Regulatoren

Genaktivatoren und -repressoren werden durch viele Mechanismen reguliert. In manchen Fällen bindet der Repressor oder Aktivator an den Promotor seines eigenen Gens und kontrolliert seine eigene Transkription; dies wird als **autogene Regulation** bezeichnet.

Die Wirkung vieler Aktivatoren und Repressoren beruht auf der Aktivierung von kleinen Molekülen, wie CRP und LacI. In manchen Fällen benötigt ein Repressor einen **Corepressor**, um aktiv zu sein. So reprimiert beispielsweise ArgR in Anwesenheit von Arginin das Operon für die Argininbiosynthese. Arginin ist ein Corepressor und stellt sicher, dass die Bakterien die Aminosäure nicht synthetisieren, wenn es nicht notwendig ist.

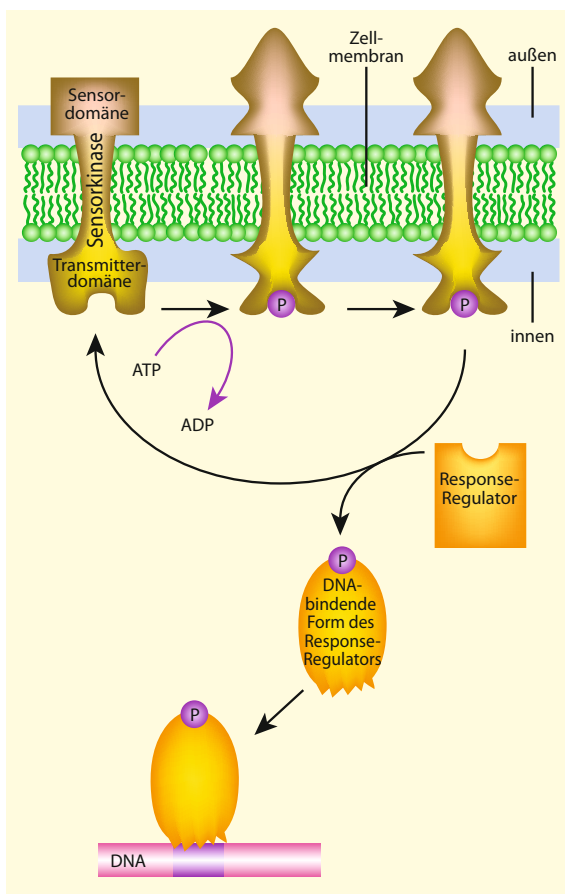
In vielen Fällen werden Aktivatoren und Repressoren auch durch die kovalente Addition von Phosphat-, Methyl- und Acetylgruppen wie auch von AMP- und ADP-Ribose modifiziert. Das **Zwei-Komponenten-Regulationssystem** von Bakterien überträgt Phosphatgruppen vom Sensorprotein auf ein Regulatorprotein (Abb. 2.9). Das erste Protein, die **Sensorkinase**, nimmt eine Veränderung der Umgebung wahr und ändert ihre Konformation. Dadurch phosphoryliert sich die Kinase mithilfe von ATP selbst. Die Phosphatgruppe wird anschließend auf das Regulatorprotein (ein Aktivator oder Repressor) übertragen, der seine Konformation ebenfalls ändert und nun an die DNA zu binden vermag. Der phosphorylierte Regulator bindet nun an seine Erkennungsstelle am Zielpromotor. Dadurch wird die Transkription des Operons entweder stimuliert oder reprimiert.

Es gibt in Bakterien viele verschiedene Zwei-Komponenten-Systeme, die auf eine Vielzahl von

Umweltbedingungen reagieren. Ist der Sauerstoffgehalt z.B. niedrig, dann verändert das ArcAB-System die Genexpression entsprechend. Das ArcB-Protein ist die Sensorkinase und besitzt drei Phosphorylierungsstellen. Der ArcA-Regulator hat nur eine Stelle, die phosphoryliert werden kann. Die Phosphatgruppe wird über ein **Phosphorelay**-System von einer Stelle an die nächste weitergegeben, wodurch schließlich die Transkription der Gene reguliert wird. Diese Formen von Phosphorelays sind insbesondere bei Eukaryoten, bei denen es oft mehr als zwei Komponenten gibt, sehr weit verbreitet.

Prokaryotische Regulatoren werden durch viele verschiedene Mechanismen reguliert, sodass das entsprechende Gen nur dann exprimiert wird, wenn es tatsächlich notwendig ist.

Die Regulation der Transkription in Eukaryoten

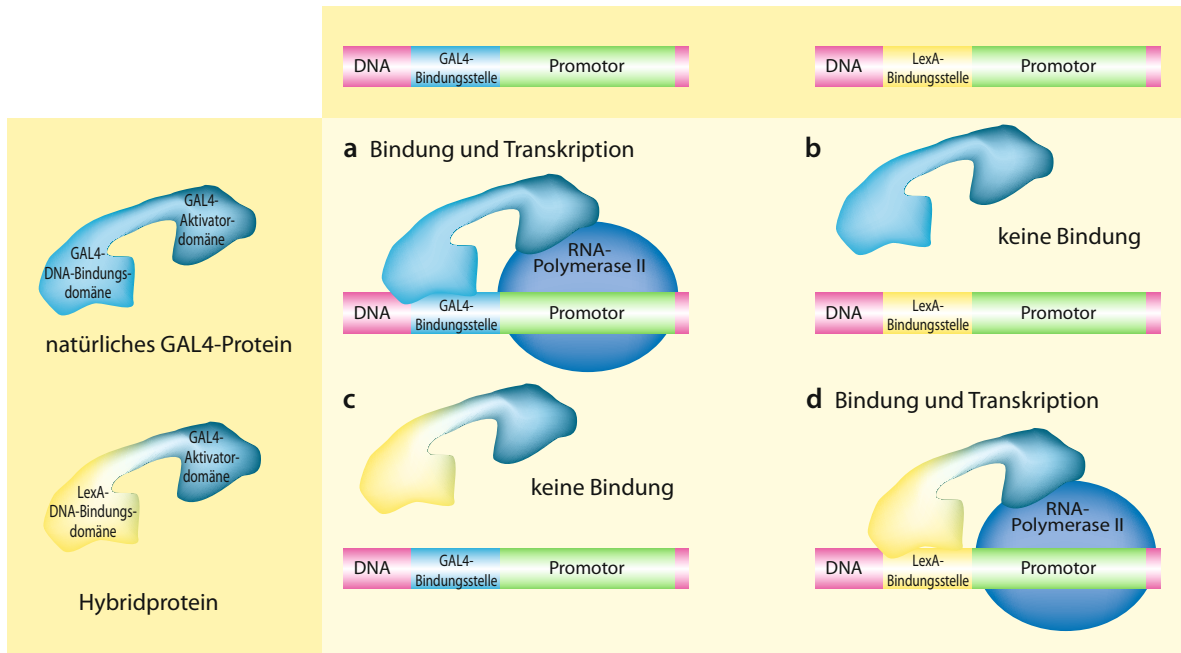


2.9 Modell des Zwei-Komponenten-Regulationssystems

Das Zwei-Komponenten-Regulationssystem besteht aus einer membrangebundenen Komponente (Sensorkinase) und einer cytoplasmatischen Komponente (Regulator). Außerhalb der Zelle detektiert die Sensordomäne der Kinase eine Veränderung der Umgebung, die zur Phosphorylierung der Transmitterdomäne führt. Die Phosphatgruppe wird auf das Response-Regulator-Protein übertragen, das daraufhin seine Konformation ändert und an die DNA bindet.

So wie die Initiation der Transkription in Eukaryoten komplexer ist als in Prokaryoten, so trifft dies auch auf deren Regulation zu. Die Mechanismen, die festlegen, welches Gen zu welchem Zeitpunkt exprimiert wird, sind sehr kompliziert. Die Tatsache, dass eukaryotische DNA um Histone gewunden ist, hindert viele Proteine an einer DNA-Bindung, wodurch der Zugang von Aktivatoren und Repressoren verzögert wird. Eine weitere Hürde für die meisten Proteine ist die Kernhülle. Betrachten wir nur die Komplexität des menschlichen Körpers mit allen seinen Geweben. Jedes Gen in jeder Zelle darf ausschließlich zu dem Zeitpunkt und nur in der Stärke exprimiert werden, wie es notwendig ist. Neben den normalen Organfunktionen und den Veränderungen während der Entwicklung hat auch die Umgebung einen großen Einfluss auf unseren Körper. Veränderungen in der Genexpression helfen uns, uns anzupassen. Insgesamt sind Anzahl und Formen der Genregulation sehr beeindruckend. Auch andere Eukaryoten wie Mäuse, Ratten, *Arabidopsis*, *C. elegans* und sogar die relativ einfache Hefe verfügen über ähnlich komplexe Kontrollsysteme.

Es gibt viele unterschiedliche Transkriptionsfaktoren für eukaryotische Gene, und sie bestehen alle aus zwei Domänen: die eine bindet an die DNA und die andere bindet an einen Bereich des Transkriptionsapparates. Die beiden Domänen sind miteinander verbunden, funktionieren jedoch auch, wenn sie voneinander getrennt sind (Abb. 2.10). Wird die DNA-bindende Domäne eines Transkriptionsregulators mit der Aktivierungsdomäne eines anderen Regulators verknüpft, dann ist das Hybridprotein funktionell, wobei jeder Teil seine ursprünglichen Eigenschaften beibehält. Das heißt, die DNA-bindende Domäne wird die gleiche Sequenz binden, wie zuvor, und die Aktivierungsdomäne wird die Transkription genau wie zuvor aktivieren. Diese Eigenschaft lässt sich zur Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen zwei neu charakterisierten Proteinen nutzen.



2.10 Transkriptionsfaktoren haben zwei unabhängige Domänen

a Eine Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors bindet normalerweise an die GAL4-Bindungsstelle auf der DNA und die andere an den Transkriptionsapparat. **b** Wird die GAL4-Bindungsstelle auf der DNA durch die LexA-Sequenz ersetzt, erkennt oder bindet der Transkriptionsfaktor die DNA nicht. **c** Ein künstliches Protein, bei dem die LexA-Bindungsdomäne mit einer GAL4-Aktivator-domäne kombiniert wurde, wird nicht an die GAL4-Bindungsstelle auf der DNA binden. **d** Das künstliche Protein bindet jedoch an die LexA-Bindungsstelle auf der DNA und aktiviert die Transkription. Die GAL4-Aktivator-domäne wirkt also unabhängig von einer Erkennungssequenz. Sie funktioniert, solange sie einen engen Kontakt zur DNA hat.

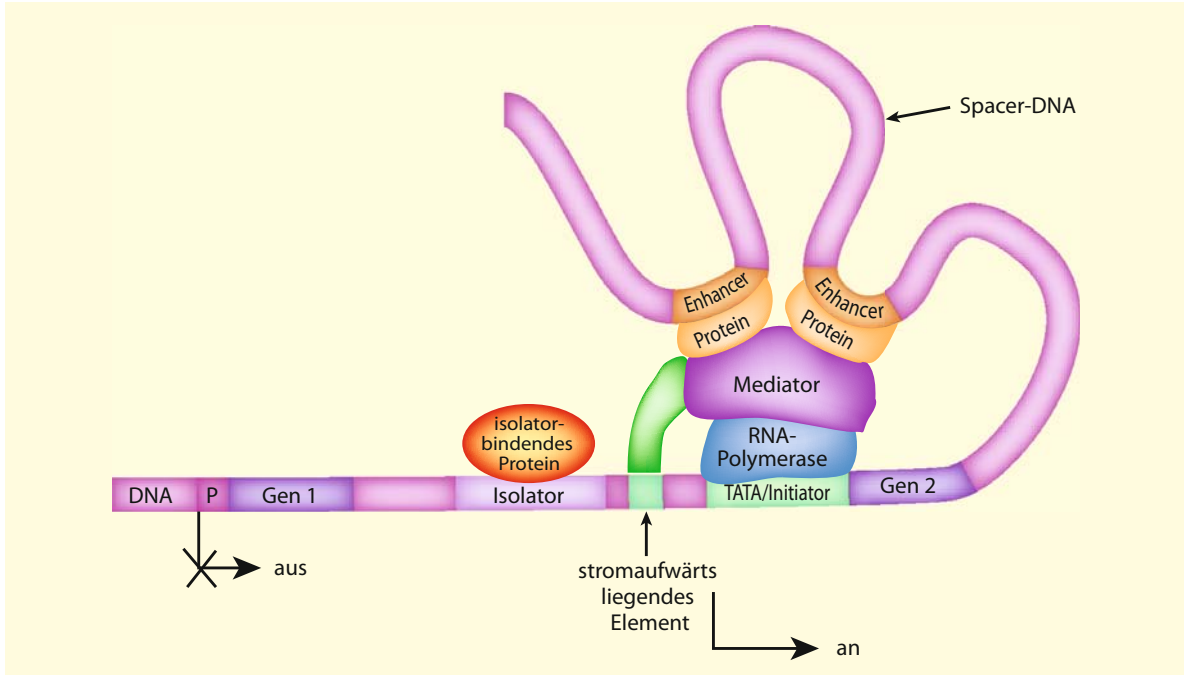
Das Verfahren wird als *yeast two hybrid*-System bezeichnet (s. Kap. 9).

Transkriptionsfaktoren wirken über einen Komplex aus vielen Proteinen, der als **Mediatorkomplex** bezeichnet wird (Abb. 2.11). Diese Proteine empfangen die Signale von jedem der Aktivatorproteine, summieren die Information auf und übertragen das Ergebnis auf die RNA-Polymerase II. Der Mediator enthält ungefähr 20 verschiedene Proteine, von denen die meisten den Kern bilden. Die Anwesenheit der anderen Proteine kann abhängig von der Zelle oder dem Organismus variieren. Von diesen akzessorischen oder Hilfsproteinen nahm man ursprünglich an, sie seien Coaktivatoren oder Corepressoren, da ihr Vorhandensein vom Gewebe abhängt.

Der Mediatorkomplex befindet sich direkt auf der RNA-Polymerase II und erhält Informationen von Aktivatoren oder Repressoren. Diese Proteine können an Bereiche direkt stromaufwärts der RNA-Polymerase II und des Mediatorkomplexes binden. Eukaryotische Transkriptionsfaktoren vermögen allerdings

auch an DNA-Sequenzen zu binden, die als **Enhancer** bezeichnet werden und die Tausende von Basenpaaren vom Promotor entfernt liegen können. Auch in diesem Fall bindet das Regulatorprotein direkt an den Komplex. Die Enhancer-Elemente wirken in beide Richtungen, doch sie beeinflussen nur Gene, die in relativer Nähe liegen. Die vorherrschende Meinung ist, dass die DNA eine Schleife ausbildet, sodass der Enhancer in die Nähe des Promotors rückt.

Isolatoren sind DNA-Sequenzen, die verhindern, dass Enhancer die falschen Gene aktivieren. Sie befinden sich zwischen Enhancern und den Genen, die nicht von diesen reguliert werden sollen. Das **isolatorbindende Protein (IBP)** erkennt die Isolatorsequenzen und hemmt die Wirkung von Enhancern, die auf der vom Gen abgewandten Seite des Isolators liegen (s. Abb. 2.11). Isolatorsequenzen können durch Methylierung reguliert werden. Ist die DNA-Sequenz methyliert, dann kann IBP nicht binden und für den Enhancer ist der Zugang zu dem hinter dem Isolator gelegenen Promotor frei.



2.11 Enhancer und Isolatorsequenzen

Enhancer liegen viele Hundert Basenpaare von dem Gen entfernt, das sie regulieren. Sie binden spezifische Proteine, die mit dem Mediatorkomplex in Wechselwirkung treten, indem sie die DNA biegen. In diesem Beispiel interagieren die Enhancer-Proteine nur mit Gen 2, weil das isolatorbindende Protein den Zugang zu Gen 1 verhindert.

Ein eukaryotischer Transkriptionsfaktor besitzt zwei Domänen. Die DNA-bindende Domäne bindet am Promotor an die DNA und die Aktivator-domäne besitzt Bereiche für die Initiation der RNA-Polymerase-Aktivität.

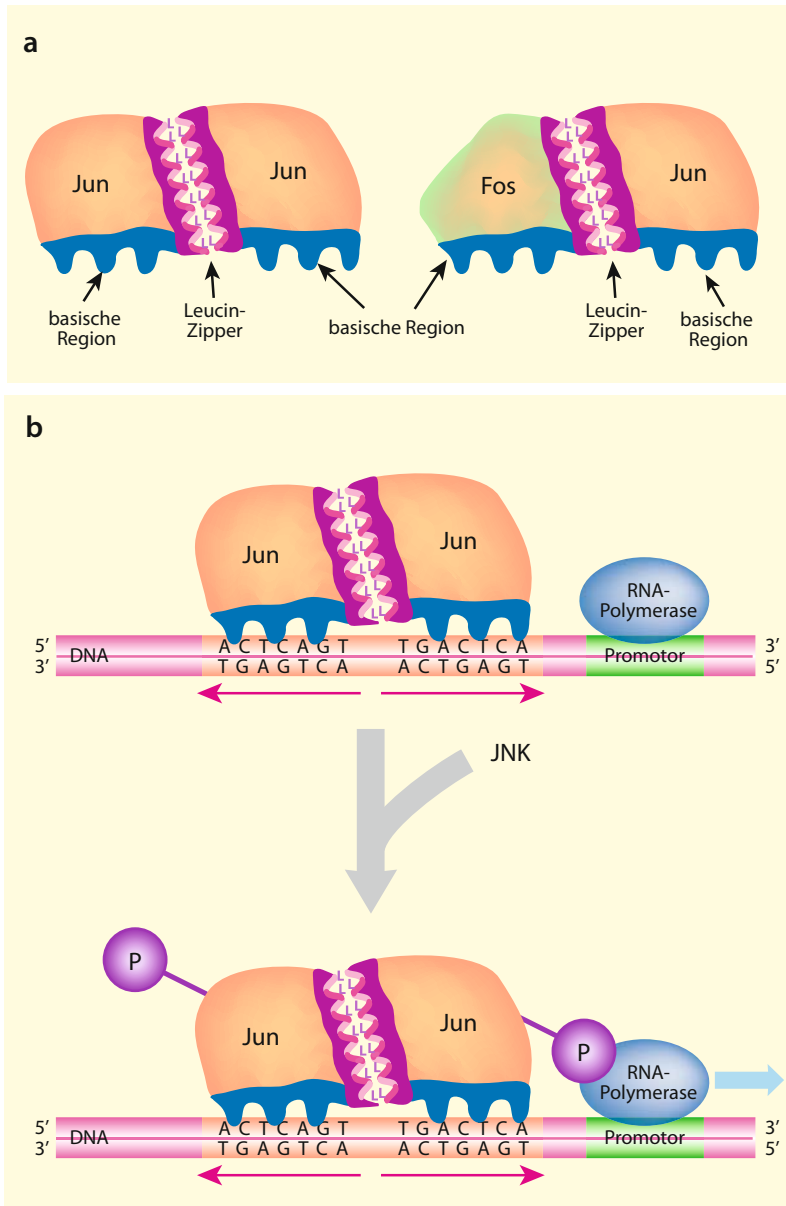
Eukaryotische Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression, indem sie an den Mediatorkomplex binden. Isolatorsequenzen verhindern, dass Transkriptionsfaktoren an den falschen Promotor binden. Enhancer-Sequenzen liegen weit vom Promotor entfernt, doch durch die Bildung einer Schleife können sie direkt an den Mediator binden.

Eukaryotische Enhancer-Proteine für die Transkription

Ein Beispiel für einen eukaryotischen Transkriptionsfaktor, der in manchen Zelltypen als Aktivator aktiv ist, ist **AP-1 (Aktivatorprotein-1)**. AP-1 beeinflusst viele Gene und reagiert auf ein breites Spektrum von Reizen. Zu den stärksten Stimulatoren von

AP-1 gehören Wachstumsfaktoren und UV-Strahlung. Wachstumsfaktoren fördern das Zellwachstum, und UV-Strahlung tötet Zellen, sodass die von AP-1 aktivierten Gene relativ verschiedenartig sind. Die komplexen Wirkungen dieses Transkriptionsfaktors werden immer noch untersucht.

AP-1 ist ein Dimer aus zwei Proteinen, Fos und Jun, der Faktor erkennt die palindromische Sequenz 5'-TGACTCA-3' (Abb. 2.12). Das Dimer gehört zu einer Familie von DNA-bindenden Proteinen, die als **bZIP-Proteine** bezeichnet werden. Die Proteine besitzen einen Leucin-Zipper, durch den sich die Bindungspartner so einander nähern, dass Dimere entstehen. Sie haben Bereiche aus basischen Resten, die mit der DNA in Kontakt treten. (Leucin-Zipper sind α -helikale Elemente, bei denen ein Randbereich der Helix zum Großteil aus Leucin besteht. Zwei solche Leucinbereiche assoziieren durch hydrophobe Wechselwirkungen und können zwei unterschiedliche Proteine miteinander verbinden.) Jun kann entweder mit sich selbst dimerisieren oder an Fos binden. Im Gegensatz dazu bindet Fos zwar an Jun, bildet aber keine Dimere mit einem zweiten



2.12 Eukaryotische Regulation der Transkription

a AP-1 ist ein eukaryotischer Transkriptionsfaktor, der aus Fos und Jun besteht. Diese zwei Proteine treten über ihre Leucin-Zipper in Wechselwirkung. **b** Um die Transkription zu aktivieren, muss AP-1 selbst zunächst mithilfe der Kinase JNK durch Phosphorylierung aktiviert werden. Nur dann stimuliert Jun die RNA-Polymerase II zur Transkription der entsprechenden Gene.

Fos-Molekül. Fos und Jun haben außerdem Aktivierungsdomänen, die zelluläre Signale aufnehmen, welche deren Aktivität entweder steigern oder vermindern. Auch vermögen andere Proteine an Fos und Jun zu binden, wodurch sich die Erkennungssequenz verändert. Diese anderen Proteine wie ATF, Maf und Nr1 tragen zur Komplexität der Transkriptionskontrolle durch AP-1 bei.

Wird AP-1 stimuliert, dann ist das die Folge von zwei unterschiedlichen Prozessen. Erstens synthe-

tisiert die Zelle mehr Fos- und Jun-Proteine durch eine verstärkte Expression der entsprechenden Gene. Außerdem werden die Proteine selbst stabiler und nicht so rasch abgebaut. Zweitens wird die Aktivität von Fos und Jun durch Phosphorylierung ihrer Aktivierungsdomäne mithilfe von **JNK** (engl. *Jun N-terminal kinase*) stimuliert. Viele andere zelluläre Signalproteine beeinflussen die Aktivität von Fos und Jun, doch JNK ist das wirkungsvollste. Die Phosphorylierung von Fos und Jun führt zu

einer Wechselwirkung mit dem Mediatorkomplex und der RNA-Polymerase II. Sie beeinflusst auch andere Signalproteine und aktiviert andere Gene.

Der eukaryotische Transkriptionsfaktor AP-1 besteht aus zwei verschiedenen Proteinen, die als Dimer aktiv sind. Die Proteinfamilie, zu der AP-1 gehört, wird auch durch posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierung reguliert.

Die DNA-Struktur beeinflusst den Zugang von Proteinen zum Promotor

Wie bereits zuvor erwähnt, hat die Struktur der eukaryotischen DNA einen großen Einfluss auf die Bindung von Proteinen an die DNA. Während der Interphase sind eukaryotische Chromosomen nicht kondensiert und bilden Schleifen, die an die Kernmatrix geheftet sind (s. Kap. 1). Diese Struktur unterstützt die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Das Ausmaß der Kondensierung zu Heterochromatin ist ein entscheidender Faktor. Eukaryotische DNA ist um Histone gewunden und bildet so Strukturen, die man als Nucleosomen bezeichnet. (Diese bilden wiederum die „Perlenkettenstruktur“ des Chromatins; s. Kap. 1.) Locker gepackte Nucleosomen bieten den Transkriptionsfaktoren einen Zugang zur DNA. Sind die Nucleosomen dagegen fest fixiert, ist allen anderen Proteinen der Zugang unmöglich. Die Dichte der Nucleosomen kann daher die Transkriptionsinitiation regulieren.

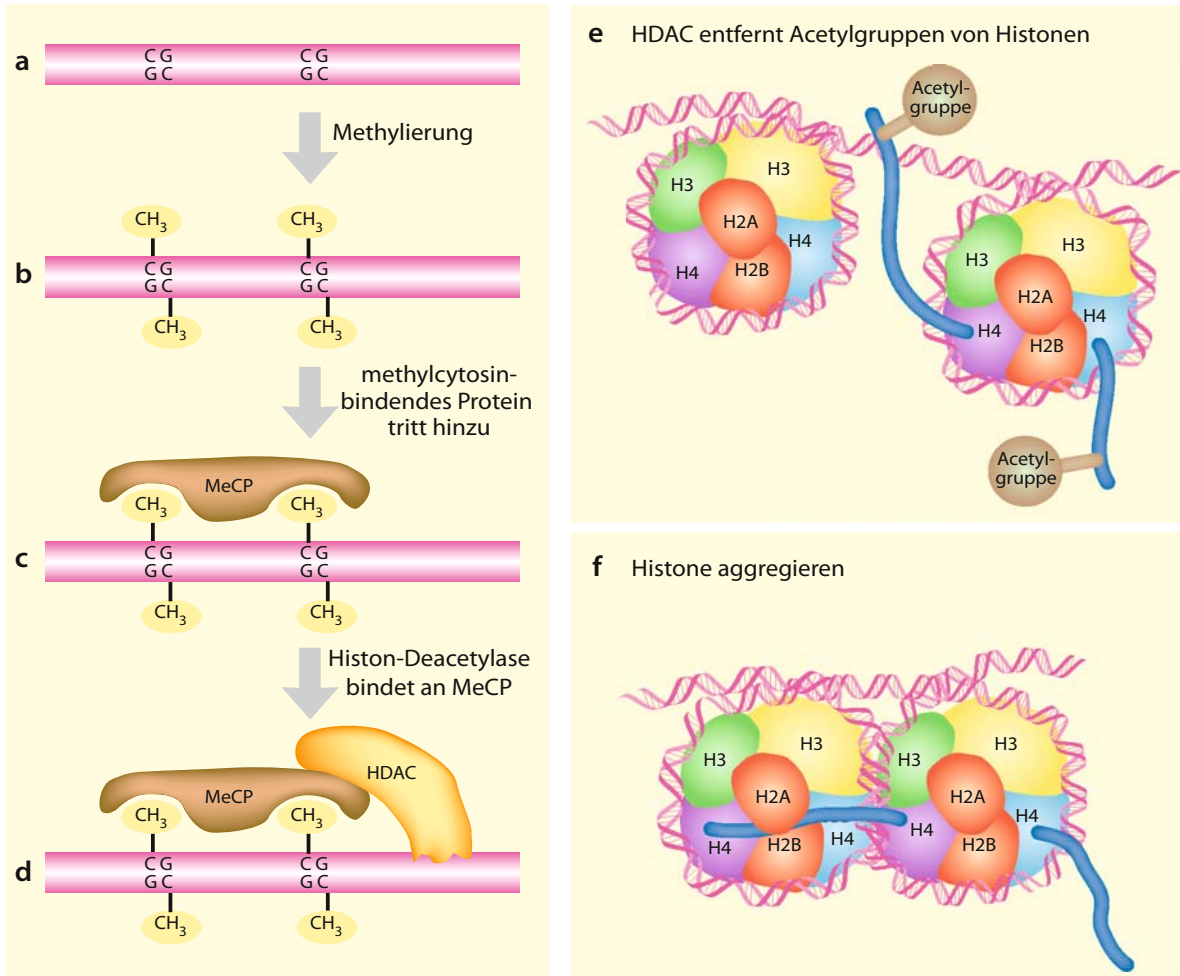
Die Histonproteine haben einen Schwanz, der durch Enzyme, die als **Histon-Acetyltransferasen (HATs)** bezeichnet werden, acetyliert werden kann. Diese Histonschwänze stabilisieren normalerweise die DNA, indem sie an benachbarte Nucleosomen binden und so deren Aggregation bewirken. Überträgt die HAT Acetylgruppen auf die Schwänze, dann ist diese Bindung nicht mehr möglich, und die Struktur lockert sich. Um die Nucleosomen wieder fester zu verbinden, entfernen **Histon-Deacetylasen (HDACs)** die Acetylgruppen, und die Histone reagregieren (Abb. 2.13).

Eine weitere strukturelle und für die Genexpression bedeutende Eigenschaft eukaryotischer DNA ist die Methylierung (s. Abb. 2.13). In Prokaryoten lässt sich der neu synthetisierte DNA-Strang wäh-

rend der Replikation durch ein anderes Methylierungsmuster vom Matrizenstrang unterscheiden. In Eukaryoten wird die Methylierung zum **Silencing** verschiedener DNA-Bereiche eingesetzt und verhindert deren Expression. **Erhaltungsmethylasen** (engl. *maintenance methylases*) fügen Methylgruppen an die neu synthetisierte DNA an, sodass sie dasselbe Muster wie der Matrizenstrang erhält. **De novo-Methylasen** heften neue Methylgruppen an, **Demethylasen** entfernen unerwünschte Methylgruppen. Viele Gene sind in der Nähe von DNA-Bereichen lokalisiert, die viele GC-Sequenzen enthalten und die als **CG-Inseln** (oder CpG-Inseln) bezeichnet werden. Sind diese methyliert, werden die in der Nähe liegenden Gene nicht exprimiert, sind sie nicht methyliert, findet die Expression statt. Die Methylierungsmuster sind vom Gewebe abhängig. So sind die CG-Inseln in Muskelzellen vor den Genen, deren Produkte für die Funktion des Muskels notwendig sind, nicht methyliert; in anderen Geweben haben die muskelspezifischen Gene jedoch methylierte CG-Inseln.

Das Silencing durch DNA-Methylierung kann ein Gen betreffen oder auch Regionen, die so groß sind wie ein ganzes Chromosom. Bereiche, die stillgelegt werden, haben zunächst methylierte CG-Regionen. Die methylierte DNA zieht **methylycytosinbindende Proteine** an, die eine Bindung von anderen DNA-bindenden Proteinen hemmen und auch HDACs anziehen. Diese deacetylieren die Histonschwänze, wodurch das Chromatin kondensiert und eine weitere Genexpression verhindert wird. Solche Bereiche bezeichnet man als Heterochromatin.

Die Methylierungsmuster haben einen starken Einfluss auf die Entwicklung, weil die Genexpression während dieser Phase streng kontrolliert werden muss. Einige Gene bleiben im Gameten methyliert, wohingegen andere Gene demethyliert werden müssen, um aktiv werden zu können. Von **Prägung** (engl. *imprinting*) spricht man, wenn ein Gen eines Elters im Gameten methyliert wird und im neuen Organismus methyliert bleibt. Dieses betrifft allerdings nur wenige Gene. Im Gegensatz dazu verändern nichtgeprägte Gene während der Entwicklung ihr Methylierungsmuster. Die Prägung kann in männlichen und weiblichen Gameten unterschiedlich sein, was Voraussetzung für die unterschiedliche Genexpression bei den Geschlechtern ist. Eine spezielle Form der Prägung ist die **X-Inaktivierung**, bei der das zweite X-Chromosom in weiblichen Individuen durch Methylierung vollständig (bis auf einige wenige Loci) stillgelegt wird.



2.13 DNA-Methylierung induziert Gen-Silencing

Die Genexpression in Eukaryoten kann durch die Kondensierung von Chromatin abgeschaltet werden. Zunächst wird der stillzulegende Bereich methyliert. Die Methylgruppen ziehen das methylcytosinbindende Protein zu sich, welches wiederum Histone-Deacetylasen anzieht. Haben die HDAC die Acetylgruppen von den Histonschwänzen entfernt, aggregieren die Histone miteinander. Die dichte Position der Histone verwehrt anderen DNA-bindenden Proteinen den Zugang, wodurch die Genexpression in diesem Bereich stoppt.

Auch die strukturellen Eigenschaften der DNA selbst kontrollieren die Genexpression. Die Dichte der Chromatinverpackung kann Transkriptionsfaktoren daran hindern, an Enhancer-Regionen auf der DNA zu binden.

Das Anheften von Methyl-(CH₃)-gruppen an die Cytosine von CG-Inseln kontrolliert die Expression nahegelegener Gene. Diese Gruppen verhindern die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren und schaffen die Voraussetzungen für die unterschiedliche Entwicklung von männlichen und weiblichen Individuen.

Eukaryotische mRNA wird vor der Proteinsynthese prozessiert

Bakterielle mRNA kann ohne eine Veränderung translatiert werden. Und in der Tat beginnen Bakterien häufig schon während der Transkription mit der Translation ihrer mRNA (auch bekannt als „gekoppelte Transkription/Translation“). Bei eukaryotischer RNA ist dagegen eine Prozessierung erforderlich, be-

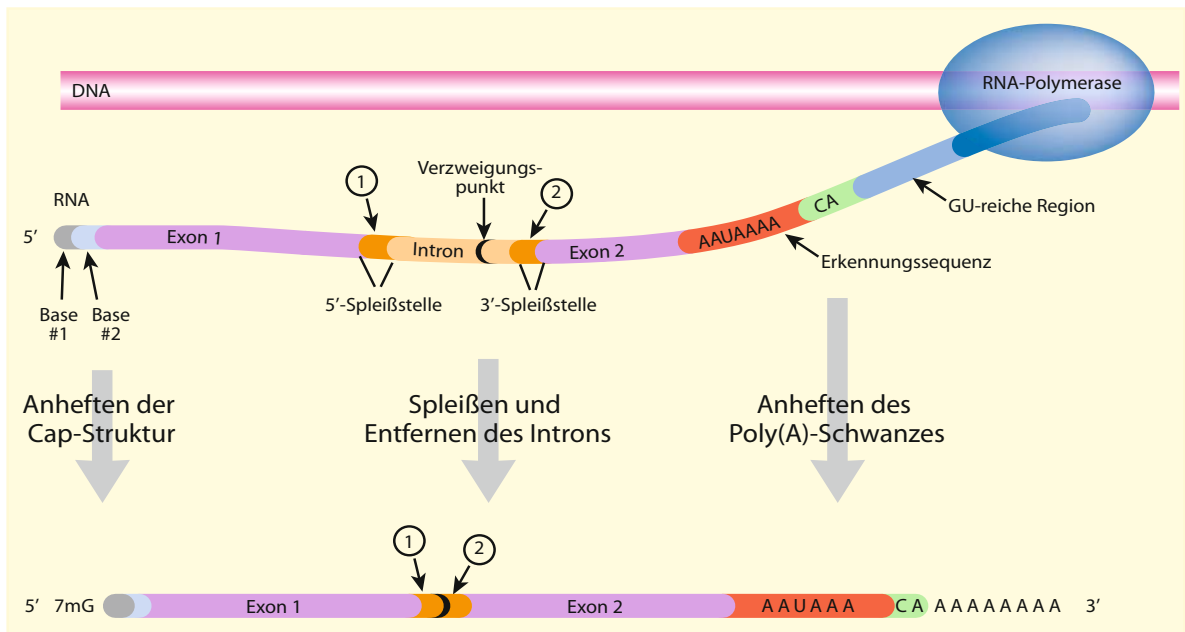
vor sie den Zellkern verlässt und in Protein translatiert werden kann. Zunächst wird an das 5'-Ende der eukaryotischen mRNA eine **Cap-Struktur** angefügt (Abb. 2.14). Diese Cap-Struktur ist ein GTP-Molekül, das in entgegengesetzter Orientierung angeheftet wird und an Position 7 der Guaninbase methyliert ist. Auch können Methylgruppen an die ersten ein oder zwei Nucleotide der mRNA angefügt werden.

Die zweite Modifikation von eukaryotischer mRNA ist das Anknüpfen einer Reihe von Adeninen – des **Poly(A)-Schwanzes** – an das 3'-Ende. Am Ende der neuen mRNA vermitteln drei Sequenzen diese Reaktion: die Erkennungssequenz (AAUAAA) für den **Polyadenylierungskomplex**, die Schnittstelle für den *cleavage binding factor* und die Erkennungssequenz für das Poly(A)-Bindungsprotein (eine Reihe von GU-Wiederholungen). Zunächst bindet der Polyadenylierungskomplex an AAUAAA und eine Endonuclease des Komplexes spaltet die mRNA hinter einem CA-Dinucleotid stromabwärts der Erkennungssequenz. Als nächstes fügt die Poly(A)-Polymerase 100 bis 200 Adeninnucleotide an, und schließlich bindet das Poly(A)-Bindungsprotein sowohl an den Poly(A)-Schwanz als auch an die Cap-

Struktur. Dadurch wird die mRNA zu einem Ring geschlossen.

Eine dritte Modifikation eukaryotischer mRNA ist das Entfernen von Introns. Eukaryotische DNA enthält zwischen den proteincodierenden Bereichen (**Exons**) viele Sequenzen, die keine Proteine codieren (**Introns**). Zunächst wird die gesamte Region in ein mRNA-Molekül transkribiert, das man als **Primärtranskript** bezeichnet. Dieses wird, nachdem die Cap-Struktur und der Poly(A)-Schwanz angeheftet wurden, prozessiert, um die Introns zu entfernen. Die Exons werden zur mRNA zusammengespliced. Proteine, die **Spleißfaktoren** genannt werden, erkennen die Exon/Intron-Grenzen, schneiden die DNA und verbinden benachbarte Exons.

Bei der Transkription eines eukaryotischen Gens entsteht zunächst ein Primärtranskript. Am 5'-Ende wird eine Cap-Struktur und am 3'-Ende ein Poly(A)-Schwanz angefügt, die Introns werden entfernt. Die mRNA wird anschließend vom Zellkern in das Cytoplasma transportiert, um dort von Ribosomen translatiert zu werden.



2.14 Prozessierung eukaryotischer mRNA

Eukaryotische RNA wird prozessiert, bevor sie für die Translation in Protein den Zellkern verlässt. Ein Guaninrest mit einer Methylgruppe wird an das 5'-Ende der RNA geheftet, ein Poly(A)-Schwanz wird an das 3'-Ende gehängt und die Introns werden herausgespleißt. Diese Veränderungen stabilisieren die mRNA und verkürzen sie im Vergleich zu dem Primärtranskript stark.

Die Übersetzung des genetischen Codes in Proteine

Der genetische Code wird in Form von Triplets oder Codons gelesen

Die mRNA liefert die Information, die ein Ribosom für die Proteinsynthese benötigt. Dieser Prozess ist als Translation bekannt, weil durch ihn die in der Nucleinsäure gespeicherte Information in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt wird. Bevor wir uns dem Mechanismus widmen, müssen wir den Code verstehen, anhand dessen die Aminosäuren zusammengesetzt werden. Nucleinsäuren bestehen aus vier verschiedenen Basen (das T in der DNA entspricht dem U in der RNA). Im Protein können dagegen 20 unterschiedliche Aminosäuren enthalten sein. Entspräche jedes Nucleotid einer Aminosäure, dann könnten nur vier verschiedene Aminosäuren codiert werden. Bei zwei Nucleotiden pro Aminosäure wären es 16 Kombinationen, was immer noch nicht ausreicht. Um die 20 Aminosäuren zu codieren, müssen die Basen in Dreiergruppen gelesen werden, denn so ergeben sich 64 verschiedene Kombinationen – mehr

als genug für die 20 Aminosäuren (Abb. 2.15). Die mRNA wird daher in Gruppen von drei Basen gelesen, die als **Triplets** oder **Codons** bezeichnet werden; jedes Basentriplett codiert eine Aminosäure. Weil es aber mehr als 20 Triplets gibt, sind viele von ihnen redundant, sodass einige Codons in die gleiche Aminosäure translatiert werden. Valin wird beispielsweise durch GUU, GUC, GUA und GUG codiert.

Der in Abbildung 2.15 dargestellte genetische Code wird als **universeller genetischer Code** bezeichnet. Nicht alle Organismen verwenden exakt diesen Code, doch Ausnahmen sind selten. So ist UGA normalerweise ein Stoppcodon, doch in *Mycoplasma* codiert UGA Tryptophan und in dem Einzeller *Euplotes* ist es Cystein.

Kleine RNA-Moleküle, die man als **Transfer-RNA (tRNA)** bezeichnet, erkennen die einzelnen Codons auf der mRNA und tragen die entsprechende Aminosäure. Diese tRNA-Moleküle werden zwar als Einzelstrang synthetisiert, doch faltet sich das Molekül und es entstehen Bereiche aus doppelsträngiger RNA. Eine solche gefaltete tRNA hat die Form eines „L“ mit einem **Anticodon** an einem Ende und einem **Akzeptorarm** an dem anderen. Das Anticodon besteht aus drei Basen, die zu denen des entsprechenden Codons auf der mRNA komplementär sind und daher dieses Codon durch Basenpaarung erkennen. Der Akzeptorarm ist die Stelle, an der die Aminosäure mit dem freien 3'-Ende der tRNA verknüpft wird (Abb. 2.16).

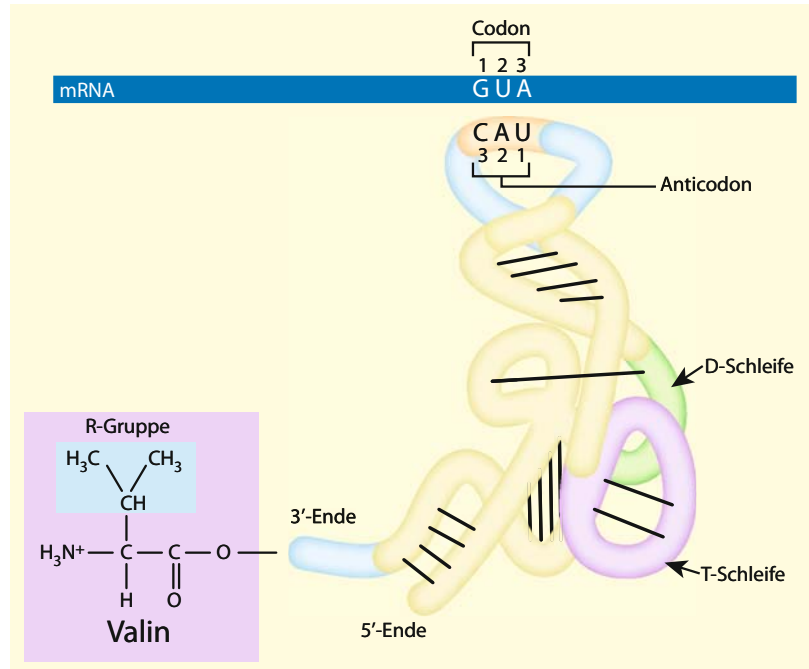
erste Base	zweite (mittlere) Base				dritte Base
	U	C	A	G	
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA stopp UAG stopp	UGU Cys UGC Cys UGA stopp UGG Trp	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G

2.15 Der genetische Code

Es sind die 64 Codons der mRNA mit ihren korrespondierenden Aminosäuren dargestellt. Gemäß der Konvention werden die Basen von 5' nach 3' gelesen, sodass sich die erste Base am 5'-Ende des Codons befindet. Drei Codons (UAA, UAG, UGA) codieren keine Aminosäure, sondern sind Stoppcodons. AUG (codiert Methionin) und, weniger häufig, GUG (codiert Valin) haben die Funktion von Startcodons. Um ein Codon zu ermitteln, muss man die erste Base in der linken Spalte suchen, die zweite dann in der obersten Zeile und die dritte in der Spalte rechts.

2.16 Die Struktur der tRNA erlaubt eine „Wobblepaarung“ an der dritten Position

Die tRNA erkennt die Codons auf der mRNA und trägt die korrekte Aminosäure für jedes Codon. Die erste Position des Anticodons einer tRNA passt zur dritten Position des Codons.



Exkurs 2.1

Der Codongebrauch

Einige Aminosäuren werden von vielen Codons codiert und haben mehr als eine korrespondierende tRNA. So wird Valin durch GUU, GUC, GUA und GUG codiert. Eine tRNA für Valin erkennt, verursacht durch das Wobbeln, GUU und GUC, doch für die anderen beiden Codons ist eine weitere tRNA notwendig. Viele Organismen verwenden allerdings für Aminosäuren mit mehreren Codons nur ein oder zwei der möglichen Codons – ein Phänomen, das als **Codongebrauch** (engl. *codon bias* oder *codon usage*) bezeichnet wird. Infolgedessen synthetisieren sie geringe Mengen an tRNA für die selten genutzten Codons. Diese Präferenz für bestimmte Codons ist bei verschiedenen Organismen unterschiedlich. Das ist von Bedeutung,

wenn Gene eines Organismus in einem anderen exprimiert werden sollen. Pflanzen und Tiere bevorzugen für die gleiche Aminosäure häufig andere Codons als Bakterien. Exprimieren Bakterien pflanzliche oder tierische Proteine, stehen für die wenig bevorzugten Codons nicht in ausreichender Menge tRNAs zur Verfügung. Die Folge ist, dass die Ribosomen innehalten, abfallen und die Proteinausbeute relativ gering ist. Um Abhilfe zu schaffen, können Forscher die Gene gentechnisch so verändern, dass häufige tRNAs die Codons erkennen (s. Kap. 14). Ein alternativer Weg ist, die Wirtsstämme gentechnisch so zu modifizieren, dass sie größere Mengen der benötigten tRNAs synthetisieren.

Doch warum trägt jede spezifische RNA auch die korrekte Aminosäure? Eine Gruppe von Enzymen, die als **Aminoacyl-tRNA-Synthetasen** bezeichnet werden, heftet die korrekte Aminosäure an die entsprechende tRNA. Diese Enzyme sind sehr spezifisch und erkennen die tRNA an ihrer Sequenz im Anticodon oder an einer anderen Stelle in der RNA-Struktur. Für jede Aminosäure existiert eine spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase.

Die erste Base des Anticodons bindet an die dritte Base des Codons auf der mRNA. Diese Nucleotide können eine sogenannte **Wobblepaarung** eingehen, statt eine perfekte Paarung zu bilden. Dadurch sind Basenpaarungen möglich, die nicht der Norm entsprechen. Ist z.B. die erste Base im Anticodon ein G, das normalerweise mit einem C paaren würde, dann kann dieses G an der Wobbleposition auch mit einem U paaren. Die tRNA für Histidin trägt daher das An-

ticodon GUG und erkennt sowohl CAC als auch CAU auf der mRNA. Nimmt U den ersten Platz im Anticodon ein, dann kann es mit A oder G an der dritten Codonposition paaren. Die Wobblepaarung erklärt, warum die gleiche tRNA verschiedene Codons erkennt, die alle die gleiche Aminosäure codieren.

Während der Translation erkennt jede tRNA eine spezifische Sequenz aus drei Nucleotiden. An die tRNA ist jeweils am gegenüberliegenden Ende die entsprechende Aminosäure gebunden. Eine Familie von spezifischen Enzymen, die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, stellt sicher, dass jede tRNA die korrekte Aminosäure trägt.

Die Proteinsynthese findet am Ribosom statt

Das Ribosom ist eine Art molekulare Maschine, die die mRNA mit den passenden tRNAs vereint und dann die Aminosäuren zu einer Kette verbindet. Prokaryotische Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten, 30S und 50S, die sich zu einem funktionellen 70S-Ribosom zusammensetzen. Ein Ribosom enthält RNA-Moleküle (**ribosomale RNA** oder **rRNA**) und viele Proteine. Die 30S-Untereinheit umfasst die 16S-rRNA und 21 Proteine; bei der 50S-Untereinheit sind es zwei rRNAs (5S und 23S) und 34 Proteine. Die größere Untereinheit besitzt drei Bindungsstellen für tRNAs, die entsprechend ihrer Funktion mit A für Akzeptor, P für Peptid und E für Exit bezeichnet werden. Die 23S-rRNA katalysiert die Verknüpfung von Aminosäuren mit der wachsenden Polypeptidkette und ist daher ein Ribozym. (Ribozyme werden in Kapitel 5 besprochen.)

In Prokaryoten sind neben dem Ribosom viele Faktoren an der Proteinsynthese beteiligt (Abb. 2.17). Zunächst muss sich das Ribosom an der Startstelle zusammenbauen und am Startcodon mit der Proteinsynthese beginnen. Die 5'-nichttranslatierte Region auf der mRNA (s. oben) trägt die Signalsequenz für die Bindung des Ribosoms vor dem Startcodon. In Prokaryoten beginnt die Translation am ersten AUG-Codon nach der **Shine-Dalgarno-Sequenz**, der Ribosomenbindungsstelle, die die Consensussequenz UAAGGAGG besitzt. Die **Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz** befindet sich auf der 16S-rRNA der kleinen 30S-Untereinheit. Zunächst bindet die kleine ribosomale Untereinheit an die Shine-Dalgarno-Sequenz.

Für die Initiation der Translation in Prokaryoten sind das Methioninderivat **N-Formylmethionin (fMet)** und eine spezielle Initiator-tRNA (**tRNA_i**) notwendig. Nur die mit fMet beladene Initiator-tRNA (als **tRNA_i^{fMet}** bezeichnet) kann an die kleine Untereinheit des Ribosoms binden.

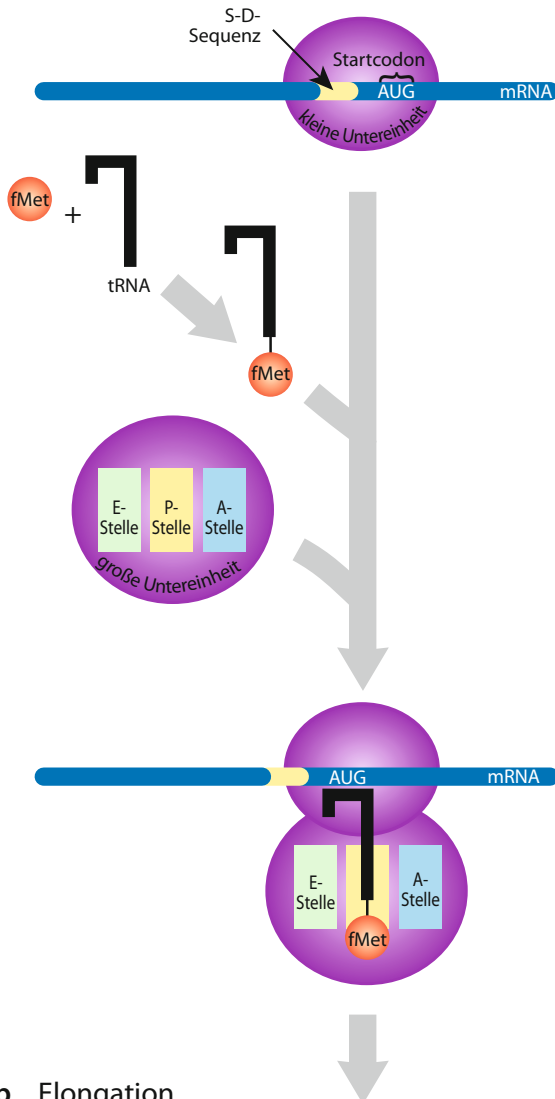
Translationsfaktoren sind Proteine, die benötigt werden, um die Bestandteile des Ribosoms und des Translationskomplexes zusammenzuführen. Die **Initiationsfaktoren** (IF1, IF2 und IF3) setzen den **30S-Initiationskomplex** zusammen, der aus der ribosomalen 30S-Untereinheit und der tRNA_i^{fMet} besteht. Der IF3-Faktor verlässt anschließend den Komplex und die ribosomale 50S-Untereinheit bindet, wodurch sich der **70S-Initiationskomplex** bildet (s. Abb. 2.17a).

Nun kann die Synthese des Polypeptids beginnen (s. Abb. 2.17b). Die tRNA_i^{fMet} besetzt die P-Stelle des Ribosoms. Eine zweite tRNA erkennt das nächste Codon und belegt die A-Stelle. Schließlich wird durch die **Peptidyltransferase**-Aktivität der 23S-rRNA eine Peptidbindung zwischen der ersten und der zweiten Aminosäure geknüpft. fMet setzt seine tRNA frei, die sich zur E-Stelle bewegt, wodurch die zweite tRNA an die P-Stelle gelangt und der Zyklus von neuem beginnen kann. Eine dritte tRNA erkennt das nächste Codon usw.

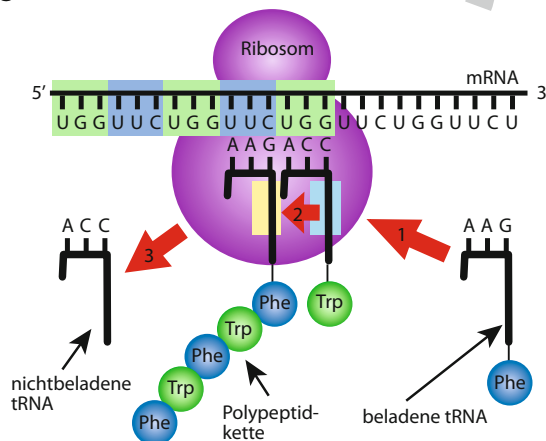
Den Prozess, bei dem nacheinander Aminosäuren zu einer Kette verknüpft werden, bezeichnet man als **Elongation**. Er erfordert sogenannte **Elongationsfaktoren**. EF-T ist ein Proteinpaaar (EF-Tu und EF-Ts), wobei EF-Tu GTP verwendet, um die A-Stelle mit einer neuen tRNA zu besetzen, und EF-Ts das GDP für den nächsten Zyklus gegen GTP austauscht. Bei der **Translokation** bewegt sich die tRNA von der P-Stelle zur E-Stelle und die mRNA verschiebt sich gleichzeitig im Ribosom um ein Codon. E- und A-Stelle können nicht gleichzeitig besetzt sein. Die entladene tRNA muss das Ribosom verlassen, bevor die nächste tRNA hinzutreten kann. EF-G überwacht den Translokationsschritt.

Aminosäuren werden an das wachsende Ende der Kette angefügt. Der Prozess wird fortgeführt, bis das Ribosom an ein Stoppcodon (UAA, UAG, UAA) gelangt, das von keiner der tRNAs erkannt wird. Stattdessen binden Proteine, die als **Freisetzungsfaktoren** bekannt sind, an das jeweilige Stoppcodon (s. Abb. 2.17c). RF1 und RF2 erkennen die unterschiedlichen Stoppcodons und bewirken, dass die 23S-rRNA die Bindung zwischen der letzten Aminosäure und ihrer tRNA spaltet. Der ribosomale Komplex fällt von der mRNA ab und dissoziiert. Seine Bestandteile werden für die Translation einer anderen mRNA wiederverwendet. Die

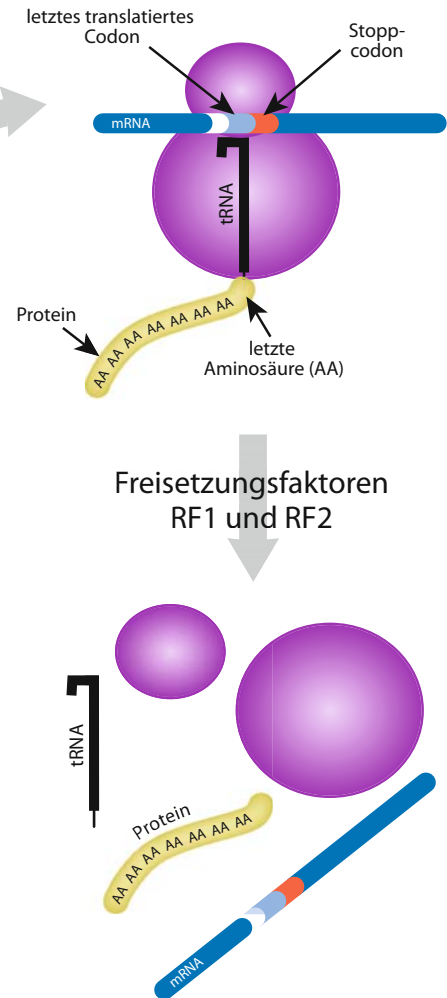
a Initiation



b Elongation



c Termination



2.17 Translation bei Prokaryoten

a Die Initiation der Translation beginnt mit der Anlagerung der kleinen ribosomalen Untereinheit an die Shine-Dalgarno-Sequenz (S-D-Sequenz) auf der mRNA. Als nächstes wird die Initiator-tRNA, die AUG erkennt, mit fMet beladen. Die beladene tRNA assoziiert mit der kleinen ribosomalen Untereinheit und findet das Startcodon. Der Zusammenbau wird durch die Initiationsfaktoren (IF1, IF2 und IF3; nicht dargestellt) unterstützt. **b** Während der Elongation wird zwischen der Aminosäure an der A-Stelle und der an der P-Stelle eine Peptidbindung geknüpft. Elongationsfaktoren kontrollieren das Gleiten des Ribosoms entlang der mRNA und die Anlagerung einer neuen tRNA an die A-Stelle (ebenfalls nicht dargestellt). **c** Die Termination erfordert Freisetzungsfaktoren. Die verschiedenen Bestandteile dissoziieren und das fertiggestellte Protein faltet sich zu einer dreidimensionalen Struktur.

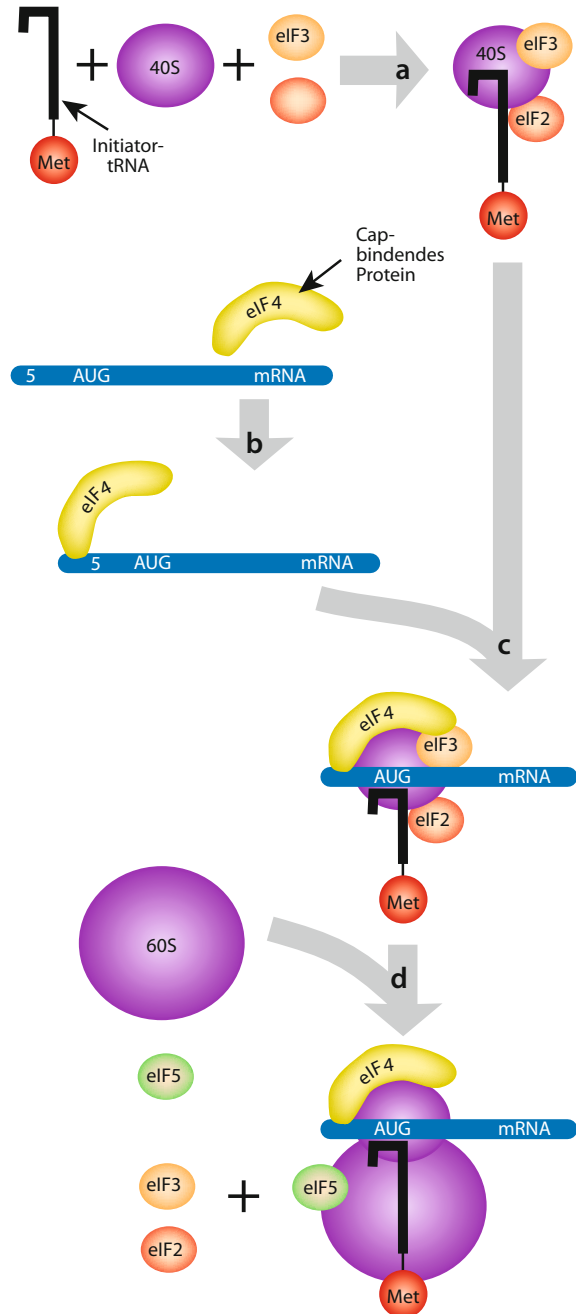
neu entstandene Polypeptidkette faltet sich zu ihrer endgültigen Struktur. In Prokaryoten binden viele Ribosomen an dieselbe mRNA, es entsteht ein **Polysom**. Da es keinen Zellkern gibt, laufen Transkription und Translation häufig gleichzeitig ab. Sobald sich die teilweise fertiggestellte mRNA von der DNA löst, binden Ribosomen und beginnen mit der Proteinsynthese.

In Prokaryoten beginnt die Translation in der 5'-nicht-translatierten Region der mRNA, die das Ribosom zunächst nach dem Startcodon absucht. Nachdem ein Initiator-methionin an das AUG angefügt wurde, katalysiert das Ribosom die Addition weiterer Aminosäuren. Ribosomen benötigen Elongationsfaktoren und Freisetzungsfaktoren, um die Bewegung entlang der mRNA bis zum Stoppcodon zu kontrollieren. Ribosomen besitzen drei verschiedene Stellen, an denen spezifische Prozesse stattfinden. An die A-Stelle tritt die neue tRNA mit dem passenden Anticodon, beladen mit der Aminosäure. An der P-Stelle befindet sich die vorherige tRNA mit der Aminosäure. Die E-Stelle ist, kurz nachdem die Aminosäuren miteinander verknüpft wurden, von der entladenen tRNA besetzt, die das Ribosom dann verlässt.

Unterschiede zwischen pro- und eukaryotischer Translation

Die Translation in Eukaryoten unterscheidet sich von der in Prokaryoten in vielerlei Hinsicht (Abb. 2.18). Als erstes fällt auf, dass die mRNA im Zellkern synthetisiert wird, die Translation jedoch an den Ribosomen des Cytoplasmas stattfindet. Dadurch ist eine Kopplung von Transkription und Translation in Eukaryoten nicht möglich. Eukaryotische Ribosomen besitzen eine 60S- und 40S-Untereinheit, die zusammen ein 80S-Ribosom bilden, das ein wenig größer ist als die bakteriellen Ribosomen. Außerdem sind in Eukaryoten mehr Initiationsfaktoren beteiligt als in Prokaryoten, und sie setzen den Initiationskomplex in einer anderen Reihenfolge zusammen. Insgesamt sind an der eukaryotischen Translation mehr Proteine beteiligt, und der gesamte Regulationsprozess ist komplexer.

Dennoch ist die Bindung der mRNA in Eukaryoten einfacher. Eukaryotische mRNA besitzt keine Shine-Dalgarno-Sequenz. Stattdessen erkennen eukaryotische Ribosomen die 5'-Cap-Struktur und



2.18 Translation in Eukaryoten

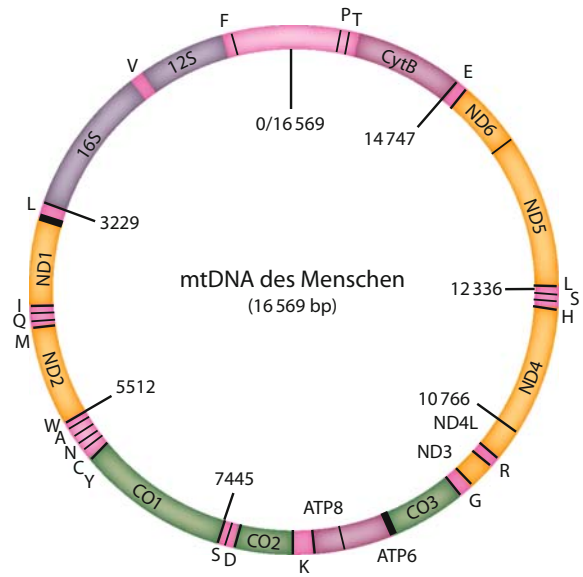
a Der Zusammenbau der kleinen Untereinheit mit Initiator-Met-tRNA umfasst die Bindung der Faktoren eIF3 und eIF2. **b** Das Cap-bindende Protein von eIF4 lagert sich an die mRNA, bevor die kleine Untereinheit hinzutritt. **c** Die mRNA bindet über das Cap-bindende Protein an die kleine Untereinheit, und der 40S-Initiationskomplex ist fertiggestellt. **d** Der Zusammenbau der großen Untereinheit erfordert den Faktor eIF5. Danach verlassen eIF2 und eIF3 den Komplex.

beginnen die Proteinsynthese am ersten AUG. Auf jeder mRNA befindet sich nur ein Gen (im Gegensatz zu Bakterien, bei denen polycistronische mRNAs häufig sind und deren Ribosomen für jede codierende Sequenz eine andere Shine-Dalgarno-Sequenz erkennen). Die erste Aminosäure in jedem neuen Polypeptid ist Methionin, wie in Bakterien. Doch im Gegensatz zu Bakterien ist dieses Methionin nicht mit einer Formylgruppe modifiziert. Und schließlich werden viele eukaryotische Proteine nach der Translation durch die Addition chemischer Gruppen modifiziert. (Obwohl auch Bakterien einige Proteine verändern, ist dieses doch viel seltener, und die Vielfalt der Modifikationen ist viel geringer.)

Prokaryotische mRNA trägt die Information für viele Proteine, und sie wird von vielen verschiedenen Ribosomen gleichzeitig translatiert. Die mRNA besitzt eine Ribosomenbindungsstelle vor jedem Operon. Eukaryotische mRNA trägt die Information für ein Gen. Das Ribosom erkennt die Cap-Struktur, sucht die mRNA ab, bis das erste AUG gefunden ist, und beginnt mit der Translation der mRNA in ein Protein.

Mitochondrien und Chloroplasten synthetisieren ihre eigenen Proteine

Die Mitochondrien und Chloroplasten der Eukaryoten besitzen ihr eigenes Genom und synthetisieren einige ihrer Proteine selbst. Die **Endosymbiontentheorie** besagt, dass diese Organellen einst freilebende Bakterien oder Blaualgen (Cyanobakterien) waren, die mit einem ursprünglichen einzelligen Eukaryoten eine symbiontische Beziehung eingegangen sind. Die Bakterien lieferten in dieser Symbiose dem frühen Eukaryoten Energie. Mit der Zeit gaben die Bakterien viele doppelte Funktionen auf und wurden von Vorläufermolekülen abhängig, die der Wirt ihnen zur Verfügung stellte. Schließlich verloren die symbiontischen Chloroplasten und Mitochondrien auch den Großteil ihrer Gene, doch bis heute besitzen sie noch einen kleinen Teil ihrer Genome. Diese Genome enthalten viele Gene, die mit der Proteinsynthese assoziiert sind (Abb.2.19). Die Organellengene sind oft enger mit bakteriellen Genen verwandt als mit den nucleären Genen des Eukaryoten. Außerdem haben die Ribosomen der



2.19 Mitochondriale DNA des Menschen

Die mitochondriale DNA des Menschen enthält Gene für rRNA (16S und 12S), einige tRNAs (diese sind durch den Ein-Buchstaben-Code gekennzeichnet) und einige Proteine der Elektronentransportkette.

Mitochondrien in tierischen Zellen eine Größe von 28S und 39S, sie liegen damit dichter bei den 30S und 50S-Untereinheiten der Bakterien als bei denen der Eukaryoten. Die Ähnlichkeit zwischen rRNA-Sequenzen von Mitochondrien und Bakterien ist viel größer als die Ähnlichkeit zur rRNA, die im eukaryotischen Zellkern codiert wird.

Mitochondrien und Chloroplasten besitzen ihr eigenes Genom, das viele transkribierte und translatierte Gene umfasst. Die Organellen gehen möglicherweise aus einst freilebenden Bakterien hervor, die eine symbiontische Beziehung mit einem einzelnen Eukaryoten eingegangen sind.

► Weiterführende Literatur

Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Wisdom R (1999) AP-1: One switch for many signals. *Exp Cell Res* 253: 180-185

DNA-Rekombinations-technologie

DNA-Isolierung und Reinigung

Elektrophorese trennt die DNA-Fragmente nach ihrer Größe

Restriktionsenzyme schneiden DNA; Ligase verknüpft DNA

Methoden zum Nachweis von Nucleinsäuren

- Radioaktive Markierung von Nucleinsäuren und Autoradiographie

- Nachweis von Nucleinsäuren mithilfe von Fluoreszenz

- Chemische Markierung mit Biotin und Digoxigenin

Komplementäre Stränge trennen sich und lagern sich wieder zusammen

Hybridisierung von DNA oder RNA in Southern- und Northern-Blots

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Allgemeine Merkmale von Klonierungsvektoren

- Nützliche Eigenschaften von Klonierungsvektoren

Spezielle Typen von Klonierungsvektoren

Einschleusen klonierter Gene in Bakterien durch Transformation

Herstellung einer Genbibliothek

Screening der Genbibliothek durch Hybridisierung

Expressionsbibliotheken in Eukaryoten

Eigenschaften von Expressionsvektoren

Subtraktive Hybridisierung

Weiterführende Literatur

DNA-Isolierung und Reinigung

Die Grundlage der gesamten biotechnologischen Forschung ist die Manipulation von DNA. Für die Arbeit mit rekombinanter DNA benötigen die Forscher eine Methode zur Isolierung von DNA aus verschiedenen Organismen. Die Gewinnung von DNA aus Bakterien ist am einfachsten, da Zellwand und Plasmamembran von Bakterien nur eine geringe Stabilität besitzen. Für Genmanipulationen werden Bakterien wie *E. coli* bevorzugt, weil sich ihre DNA leicht gewinnen lässt. *E. coli* enthält in der Zelle sowohl genomische als auch Plasmid-DNA. Genomische DNA ist viel größer als Plasmid-DNA, deshalb lassen sich beide Formen aufgrund ihrer Größe leicht voneinander trennen.

Um die DNA aus einer Zelle freizusetzen, muss man die Zellmembran zerstören. Die Hauptbestandteile der bakteriellen Zellwand, die Peptidoglykane, werden von dem Enzym **Lysozym** gespalten. Als nächstes zerstört ein Detergens die Zellmembranen, indem es die Lipiddoppelschicht angreift. Gewebeproben aus Tieren und Pflanzen müssen dagegen gemörsert werden, um die intrazellulären Bestandteile freizusetzen. Die stabilen Wände von Pflanzenzellen werden durch mechanische Scherung in einem Zerkleinerer aufgebrochen und das Wandgewebe anschließend mit Enzymen gespalten, die aus den langen Polymeren Monomere freisetzen. Aus der Schwanzspitze einer Maus lässt sich DNA gewinnen, nachdem Enzyme das Bindegewebe verdaut haben. Für jeden Organismus und jedes Gewebe müssen die Methoden für die Gewinnung der intrazellulären Komponenten leicht abgewandelt werden.

Einmal freigesetzt, müssen die zellulären Bestandteile entweder durch Zentrifugation oder durch chemische Extraktion von dem Rest der äußeren Strukturen getrennt werden. Die Zentrifugation trennt die Komponenten nach ihrer Größe; die schwereren oder größeren Moleküle sedimentieren schneller als die kleineren Moleküle. So sind z.B. die Fragmente einer Zellwand nach der Spaltung kleiner als die großen DNA-Moleküle. Bei der Zentrifugation sammelt sich die DNA als Pellet am Boden des Zentrifugationsgefäßes, während sich die löslichen Zellwandfragmente im Überstand befinden. Die chemische Extraktion nutzt die Eigenschaft von **Phenol**, unerwünschte Proteine aus der DNA-Lösung zu entfernen. Phenol ist eine Säure, die 60 bis 70 % allen organischen Materials, insbesondere Proteine, löst. Phenol ist schlecht

in Wasser löslich, und wenn es mit einer wässrigen Lösung aus DNA und Protein gemischt wird, bilden sich ähnlich wie bei Wasser und Öl zwei Phasen. Das Protein löst sich in der Phenolphase während die Nucleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben. Die beiden Phasen werden durch Zentrifugation getrennt und anschließend die wässrige DNA-Lösung von der Phenolphase isoliert.

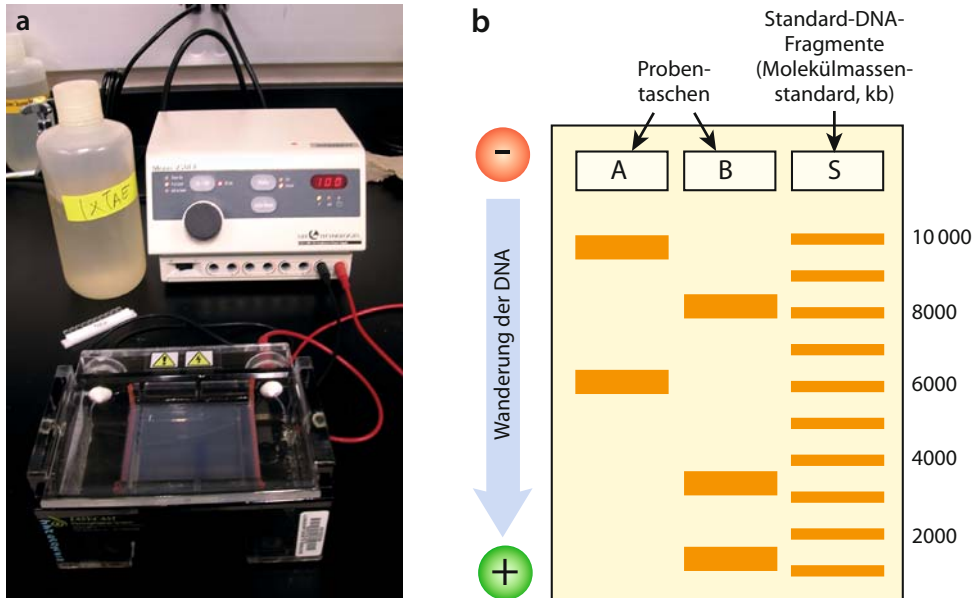
Sind die Proteine entfernt, enthält die Probe neben der DNA noch RNA, die als Nucleinsäure ebenfalls nicht in Phenol löslich ist. Das Enzym **Ribonuclease (RNase)** spaltet RNA in Ribonucleotide. Nach der Behandlung mit RNase befinden sich neben DNA noch kurze RNA-Stücke und Ribonucleotide in der Lösung. Wird ein gleiches Volumen Alkohol zugegeben, fällt die sehr große DNA aus und lässt sich durch Zentrifugation abtrennen. Die kleineren Ribonucleotide bleiben dagegen in Lösung. Die DNA ist nun bereit für die Verwendung in verschiedenen Experimenten.

DNA lässt sich isolieren, indem man zunächst die Zellwand und die Membrankomponenten entfernt. Als nächstes werden die Proteine mit Phenol extrahiert und anschließend die RNA durch Ribonuclease gespalten.

Elektrophorese trennt die DNA-Fragmente nach ihrer Größe

DNA-Fragmente lassen sich mithilfe der **Gelelektrophorese** ihrer Größe nach trennen und anschließend, nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid, durch UV-Licht sichtbar machen (Abb. 3.1). Das Gel einer solchen Gelelektrophorese besteht z.B. aus **Agarose**, ein gelatineähnliches Polysaccharid, das aus Meeresalgen gewonnen wird. Agarose ist ein Pulver, das sich nur in heißem Wasser löst. Kühlt die Lösung ab, dann erhärtet die Agarose. Um die DNA aufzutrennen und sichtbar zu machen, lässt man die Lösung auf einem horizontalen Träger abkühlen, sodass ein flaches Gel mit einer Dicke von etwa 6 mm entsteht. An einem Ende wird vor dem Abkühlen ein Kamm eingeschoben. Nach dem Erhärten wird der Kamm gezogen und in dem Gel bleiben kleine Taschen zurück.

Die Trennung der DNA-Moleküle in der Gelelektrophorese nach ihrer Größe erfolgt mithilfe eines



3.1 DNA-Gelelektrophorese

a Aufnahme einer Elektrophoreseapparatur. Das Agarosegel wird in die Mitte der Elektrophoresekammer auf einen Träger gelegt, mit Puffer überschichtet und auch die Tanks mit Puffer gefüllt. Anschließend werden die roten und schwarzen Kontakte an eine Stromquelle angeschlossen. FisherBiotech Horizontal Electrophoresis Systems, Midigel System.

b Durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennte DNA. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA. Unter UV-Licht fluoreszieren die DNA-Banden in einem hellen Orange. Die Fragmentgrößen lassen sich durch einen Vergleich mit dem Größenmarker (rechts) bestimmen.

elektrischen Feldes. Das Agarosegel wird zunächst in einer Kammer, die an einem Ende eine positive und an dem anderen Ende eine negative Elektrode besitzt, mit Puffer überschichtet. Anschließend werden die DNA-Proben in die Geltaschen geladen und eine elektrische Spannung angelegt. In dem entstehenden elektrischen Feld wandern die DNA-Fragmente nun durch das Gel. Das Phosphatrückgrat der DNA ist negativ geladen, sodass sich die Fragmente von der negativen Elektrode weg zur positiven Elektrode bewegen. Dabei wirkt die erstarrte Agarose als Sieb mit kleinen Lücken zwischen den einzelnen Agaroseketten. Die DNA-Fragmente müssen sich durch diese Lücken zwängen und werden nach ihrer Größe aufgetrennt, weil größere Moleküle dabei stärker behindert werden als kleinere.

Um die DNA sichtbar zu machen, wird das Gel aus der Kammer genommen und in eine Ethidiumbromidlösung getaucht. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare von DNA bzw. RNA. Das Ausmaß der Interkalierung ist bei RNA geringer, weil es sich größtenteils um einzelsträngige Moleküle handelt. Unter UV-Licht fluoreszieren die Nucleinsäuren

orange. DNA-Moleküle derselben Größe bilden in der Regel eine scharfe Bande. Die Größe der Fragmente lässt sich durch einen direkten Vergleich mit einem **Molekülmassenstandard** abschätzen, der gleichzeitig mit der Probe aufgetrennt wird (in einer anderen Bahn) und der DNA-Moleküle bekannter Größe enthält.

Die Größe der untersuchten DNA bestimmt die Art von Gel, das für die Auftrennung verwendet wird. In der Regel ist es Agarose, doch sehr kleine DNA-Moleküle zwischen 50 und 1000 bp werden mithilfe von Polyacrylamidgelen getrennt. Diese Gele vermögen DNA-Fragmente zu separieren, die sich in ihrer Länge nur durch ein einziges Basenpaar unterscheiden, was für die DNA-Sequenzierung notwendig ist (s. Kap. 4). Für sehr große Fragmente (10 Kilobasen bis 10 Megabasen) wird Agarose eingesetzt, doch fließt der Strom hier abwechselnd aus zwei Richtungen, die in einem bestimmten Winkel zueinander liegen. Bei dieser **Pulsfeldgelelektrophorese** (engl. *pulsed field gel electrophoresis*, **PFGE**) wandern sehr große DNA-Moleküle eine weitere Strecke, als beim Fließen des Stroms in nur eine Richtung. Bei jeder

Richtungsänderung werden große, in Agaroseporen festsitzende Moleküle entspannt, wodurch sie weiterwandern. Eine weitere Methode ist die Gradientengelelektrophorese, mit deren Hilfe sich ähnlich große Fragmente trennen lassen. Ein Konzentrationsgradient aus Acrylamid, Puffer oder Elektrolyt kann die Kompression, d.h. das Zusammendrängen von Fragmenten ähnlicher Größe, verringern und kleinere Fragmente im unteren Gelbereich abbremsen.

DNA-Fragmente lassen sich mithilfe der Gelelektrophorese nach ihrer Größe trennen. Im elektrischen Feld bewegen sich die Fragmente von der negativen Elektrode zur positiven. Die größeren DNA-Fragmente werden bei ihrer Wanderung durch die Agaroseporen stärker behindert als die kleinen und wandern daher langsamer.

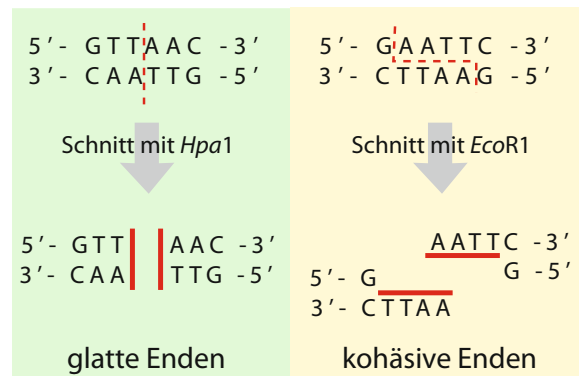
Mithilfe der Pulsfeldgelelektrophorese lassen sich große DNA-Stücke trennen. Hier fließt der elektrische Strom abwechselnd aus zwei Richtungen, die im rechten Winkel zueinander stehen.

Restriktionsenzyme schneiden DNA; Ligase verknüpft DNA

DNA-Isolierung, Auftrennung und Visualisierung von DNA-Fragmenten wären nutzlos, wenn nicht auch einige Methoden zur Verfügung stünden, um die DNA in Fragmente unterschiedlicher Größe zu schneiden. Die natürlich vorkommenden **Restriktionsenzyme** oder **Restriktionsendonucleasen** sind der Schlüssel zur Herstellung von DNA-Fragmenten. Diese bakteriellen Enzyme binden an spezifische Erkennungsstellen auf der DNA und schneiden das Rückgrat beider Stränge. Diese Enzyme sind im Laufe der Evolution entstanden, um Bakterien vor fremder DNA, beispielsweise Viren-DNA, zu schützen. Die Enzyme spalten die DNA ihrer eigenen Zelle nicht, weil sie sensitiv für Methylierungen sind. Ist die Erkennungssequenz methyliert, kann das Restriktionsenzym nicht an die DNA binden. Bakterien synthetisieren ebenfalls **Modifikationsenzyme**, die dieselbe Sequenz erkennen wie das entsprechende Restriktionsenzym und jede Erkennungsstelle im bakteriellen Genom methylieren. Daher laufen Bakterien bei der Synthese von Restriktionsenzymen nicht Gefahr, dass ihre eigene DNA gespalten wird.

Restriktionsenzyme lassen sich nutzen, um DNA an spezifischen Stellen zu schneiden, da jedes dieser Enzyme eine bestimmte Erkennungssequenz hat. Anhand der Unterschiede in den Schnittstellen kann man die Enzyme in verschiedene Klassen einteilen. **Typ-I-Restriktionsenzyme** schneiden den DNA-Strang 1000 oder mehr Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt. **Typ-II-Restriktionsenzyme** schneiden dagegen in der Mitte der Erkennungssequenz und sind für die Gentechnik am nützlichsten. Sie spalten entweder beide Stränge der Doppelhelix genau an der gleichen Stelle, es entstehen **glatte Enden**, oder sie schneiden beide Stränge leicht versetzt, wodurch einzelsträngige Enden entstehen. Diese bezeichnet man auch als **klebrige** oder **kohäsive Enden** (Abb. 3.2). Die Erkennungssequenzen von Typ-II-Restriktionsenzymen sind in der Regel umgekehrte Sequenzwiederholungen, sodass das Enzym beide Stränge zwischen den gleichen Basen spaltet. Da die Wiederholungen gegenläufig sind, können die Schnitte versetzt sein, sodass einzelsträngige überhängende Enden entstehen. Einige der in der Biotechnologie häufig verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Die Anzahl der Basenpaare der Erkennungssequenz bestimmt die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen dieser Sequenz in der DNA und daher auch die für einen Schnitt. Es ist viel wahrscheinlicher,



3.2 Typ-II-Restriktionsenzyme – glatte Enden versus kohäsive Enden

HpaI ist ein Restriktionsenzym, das glatte Enden hinterlässt, d.h., es schneidet beide Stränge exakt an derselben Stelle. *EcoRI* ist dagegen ein Enzym, das kohäsive Enden hervorruft. Das Enzym schneidet in beiden Strängen zwischen G und A, sodass an den beiden DNA-Enden ein Überhang aus vier Basenpaaren entsteht. Da diese Enden Basenpaarungen mit komplementären Sequenzen eingehen können, werden sie als kohäsiv, oder klebrig, bezeichnet.

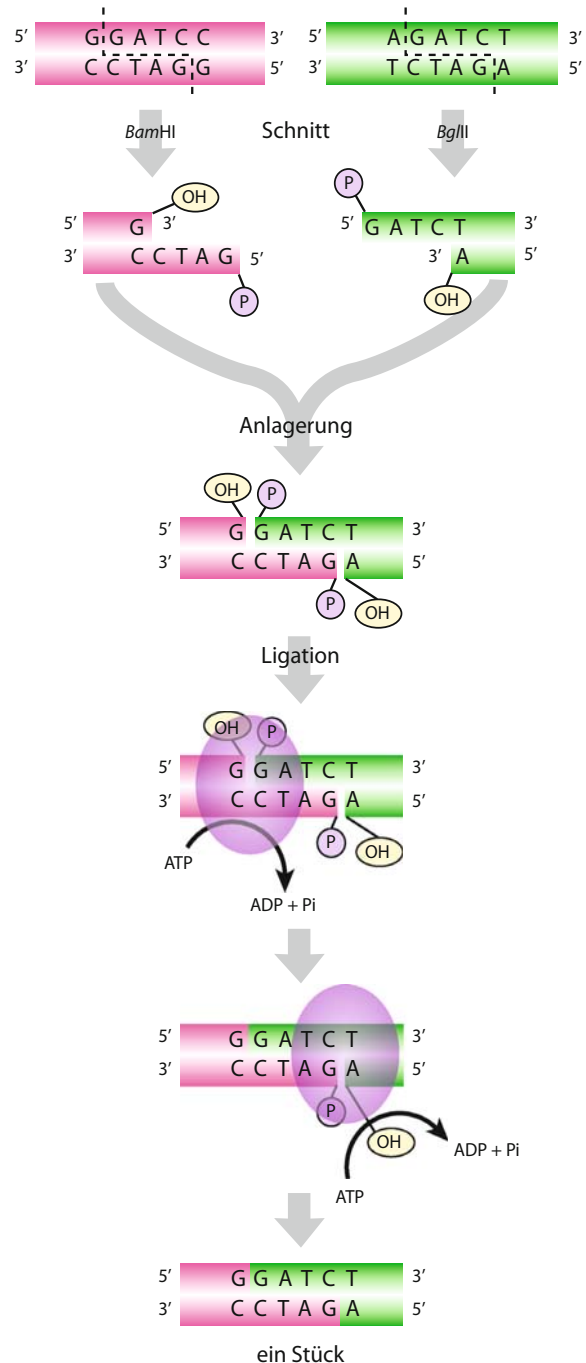
eine Sequenz aus vier Nucleotiden anzutreffen, als eine Erkennungssequenz aus sechs Nucleotiden. Um weniger und längere Fragmente zu erhalten, werden Restriktionsenzyme mit einer Erkennungssequenz von sechs oder mehr Basenpaaren verwendet. Umgekehrt ergeben Enzyme mit einer Erkennungssequenz von vier Basenpaaren mehr, aber kürzere Fragmente.

Werden zwei verschiedene DNA-Proben mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten, das kohäsive Enden produziert, dann haben alle entstehenden Fragmente identische Überhänge. Dadurch ist es möglich, Fragmente aus zwei verschiedenen Quellen (z.B. zwei unterschiedlichen Organismen) miteinander zu verbinden (Abb. 3.3). Solche Fragmente werden mithilfe der **DNA-Ligase** verknüpft, oder **ligiert**. Dabei handelt es sich um das gleiche Enzym, das auch die Okazaki-Fragmente während der Replikation miteinander verbindet (s. Kap. 4). Die am

Tabelle 3.1 Häufig verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Ursprungsorganismus	Erkennungssequenz
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C/CGG GGC/C
<i>MboI</i>	<i>Moraxella bovis</i>	/GATC GATC/
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>	/GATC GATC/
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G/AATTC CTTAA/G
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	/CCWGG GGWCC/
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i> J62/ pGL74	GAT/ATC CTA/TAG
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G/GATCC CCTAG/G
<i>SauI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CC/TNAGG GGANT/CC
<i>BglI</i>	<i>Bacillus globigii</i>	GCCNNNN/NGGC CGGN/NNNNCCG
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC/GGCCGC CGCCGG/CG
<i>DraI</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	RG/GNCCY YCCNG/GR

/, Stelle, an der das Enzym schneidet.
N, jede Base; R, ein Purin; Y ein Pyrimidin; W, A oder T.



3.3 Kompatible Überhänge werden mithilfe der DNA-Ligase miteinander verbunden

*Bam*HI und *Bgl*II produzieren die gleichen Überhänge oder kohäsiven Enden: einen 3'-CTAG-5'- und einen 5'-GATC-3'-Überhang. Diese sind zueinander komplementär, können Wasserstoffbrücken und daher Basenpaarungen ausbilden. Die Lücken im DNA-Rückgrat werden durch die T4-DNA-Ligase geschlossen, die für die Katalyse der Reaktion ATP hydrolysiert.

häufigsten verwendete Ligase stammt aus dem Bakteriophagen T4. Die Ligase katalysiert die Bindung zwischen der 3'-OH-Gruppe des einen Stranges und der 5'-PO₄-Gruppe des anderen Stranges. Das Enzym ist bei überhängenden Enden viel effizienter, doch es vermag auch glatte Enden zu verknüpfen, wenn auch langsamer. (Fragmente, die ligiert werden sollen, werden häufig mithilfe der Agarosegelelektrophorese isoliert, wie oben beschrieben wurde.)

Restriktionsenzyme sind natürlich vorkommende Enzyme, die eine bestimmte DNA-Sequenz erkennen und das Phosphatrückgrat der DNA schneiden. Werden zwei DNA-Stücke mit dem gleichen Enzym geschnitten, haben die Enden kompatible Überhänge und können durch eine Ligase wieder miteinander verbunden werden.

Methoden zum Nachweis von Nucleinsäuren

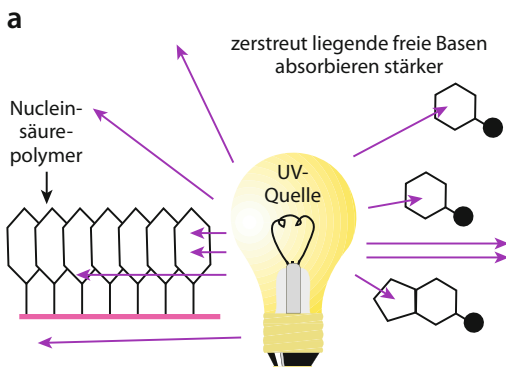
Für die DNA-Rekombinationstechnologie ist ein Nachweis von DNA essenziell. Eine der einfachsten Möglichkeiten, die DNA- oder RNA-Konzentration einer Lösung zu bestimmen, ist die Messung der Ab-

sorption von ultraviolettem Licht (Abb. 3.4). DNA, RNA und freie Nucleotide absorbieren über die Ringstrukturen ihrer Basen UV-Licht. Bei einzelsträngiger RNA und freien Nucleotiden ist die Absorption sogar stärker als bei DNA, da ihre Struktur lockerer ist. Die Stärke der Absorption wird mit der eines bekannten Standards verglichen und die Konzentration der DNA lässt sich errechnen.

Die DNA-Konzentration in einer Flüssigkeit lässt sich durch die Messung der UV-Absorption bei 260 nm bestimmen.

Radioaktive Markierung von Nucleinsäuren und Autoradiographie

Die Absorption von UV-Licht ist eine allgemeine Methode für den Nachweis von DNA, doch sie unterscheidet nicht zwischen unterschiedlichen DNA-Molekülen. DNA lässt sich auch mithilfe von radioaktiven Isotopen nachweisen (Abb. 3.5). Während der Replikation können radioaktive Isotope wie ³²P in Form einer **Phosphatgruppe** und ³⁵S in Form eines **Phosphorthioats** in die DNA eingebaut werden. Da native DNA keine Schwefelatome enthält, wird



3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

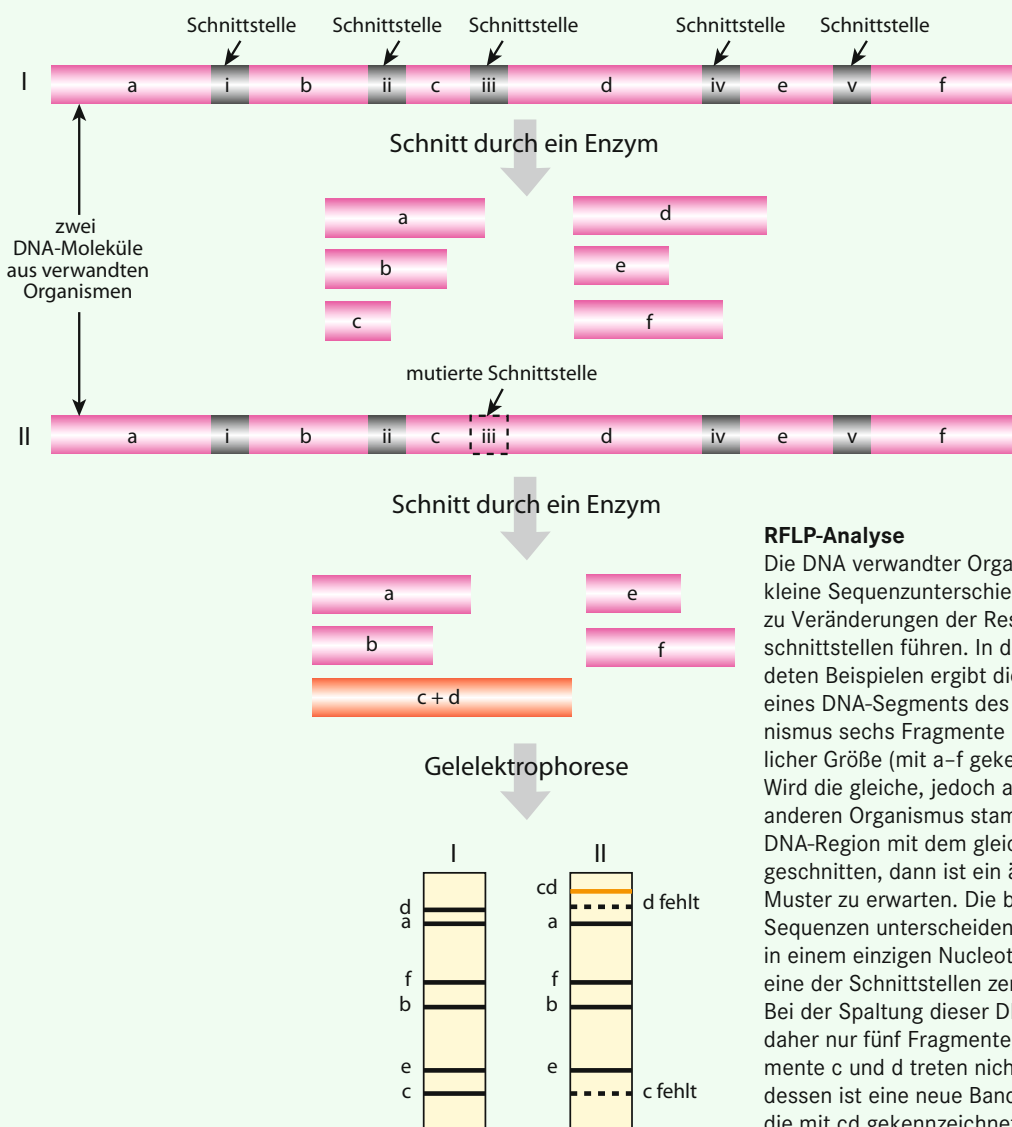
a Alle Nucleinsäuren absorbieren UV-Licht über die aromatischen Ringe ihrer Basen. Sind die Nucleotide gestapelt (links), dann ist die Absorption aufgrund der regelmäßigen Anordnung geringer als wenn die Basen verstreut sind (rechts). **b** Die DNA-Konzentration einer Lösung lässt sich durch die Messung der Absorption von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmen. Die Auftragung der Absorption gegen die Konzentration zeigt eine lineare Beziehung. Die Konzentration in einer unbekannten Probe kann man durch die Messung der Absorption bei 260 nm und einer anschließenden Extrapolation der Konzentration ermitteln.

Exkurs 3.1

Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus, um Individuen zu identifizieren

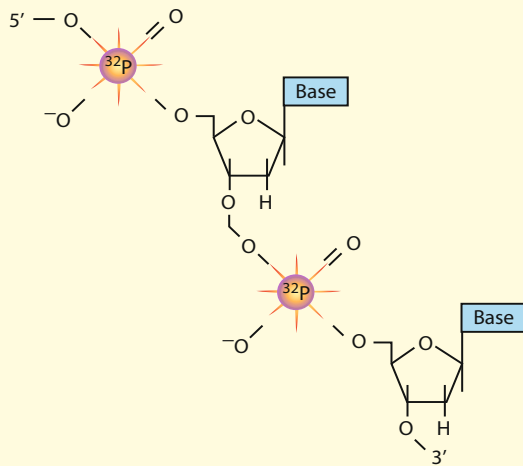
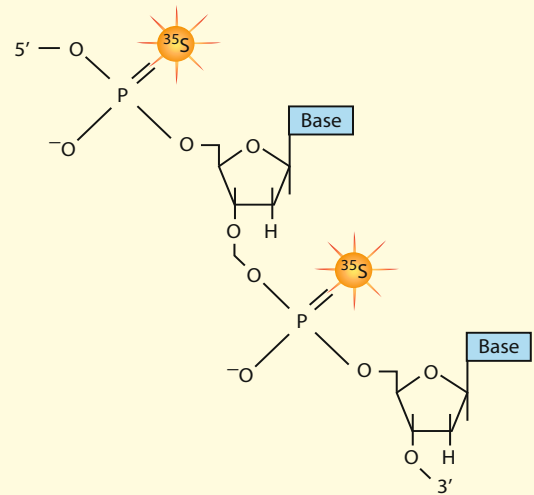
Restriktionsenzyme sind für viele Anwendungen sehr nützlich. Weil sich die DNA-Sequenz von Organismus zu Organismus unterscheidet, sind auch die Muster der Restriktionsschnittstellen unterschiedlich. Durch dieses Muster lässt sich die Quelle einer isolierten DNA eindeutig bestimmen. Wird genomische DNA eines Organismus isoliert und mit einem bestimmten Restriktionsenzym geschnitten, entsteht ein spezifischer Satz an Fragmenten, der sich elektrophoretisch trennen und sichtbar machen lässt. Wird die DNA eines anderen Organismus mit den

gleichen Enzym geschnitten, entsteht ein anderer spezifischer Satz an Fragmenten. Dieses Verfahren kann für die DNA von zwei Individuen derselben Art angewendet werden. Obwohl in einem solchen Fall die Unterschiede in der DNA-Sequenz gering sind, vermögen Restriktionsenzyme diese Unterschiede dennoch aufzudecken. Unterscheidet sich die DNA-Sequenz innerhalb einer Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym, dann ergibt sich ein **Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus** (RFLP; Abb.).



RFLP-Analyse

Die DNA verwandter Organismen weist kleine Sequenzunterschiede auf, die zu Veränderungen der Restriktionsschnittstellen führen. In den abgebildeten Beispielen ergibt die Spaltung eines DNA-Segments des ersten Organismus sechs Fragmente unterschiedlicher Größe (mit a–f gekennzeichnet). Wird die gleiche, jedoch aus einem anderen Organismus stammende DNA-Region mit dem gleichen Enzym geschnitten, dann ist ein ähnliches Muster zu erwarten. Die beiden DNA-Sequenzen unterscheiden sich hier nur in einem einzigen Nucleotid, wodurch eine der Schnittstellen zerstört wird. Bei der Spaltung dieser DNA entstehen daher nur fünf Fragmente; die Fragmente c und d treten nicht auf, stattdessen ist eine neue Bande zu sehen, die mit cd gekennzeichnet ist.

 ^{32}P -markierte DNA ^{35}S -markierte DNA

3.5 Radioaktiv markierte DNA

DNA kann in Anwesenheit von radioaktiv markierten Vorstufen synthetisiert werden. Diese Nucleotide sind mit ^{32}P (statt des nichtradioaktiven ^{31}P -Phosphors) oder mit ^{35}S (statt eines Sauerstoffatoms) im Zucker-Phosphat-Rückgrat markiert.

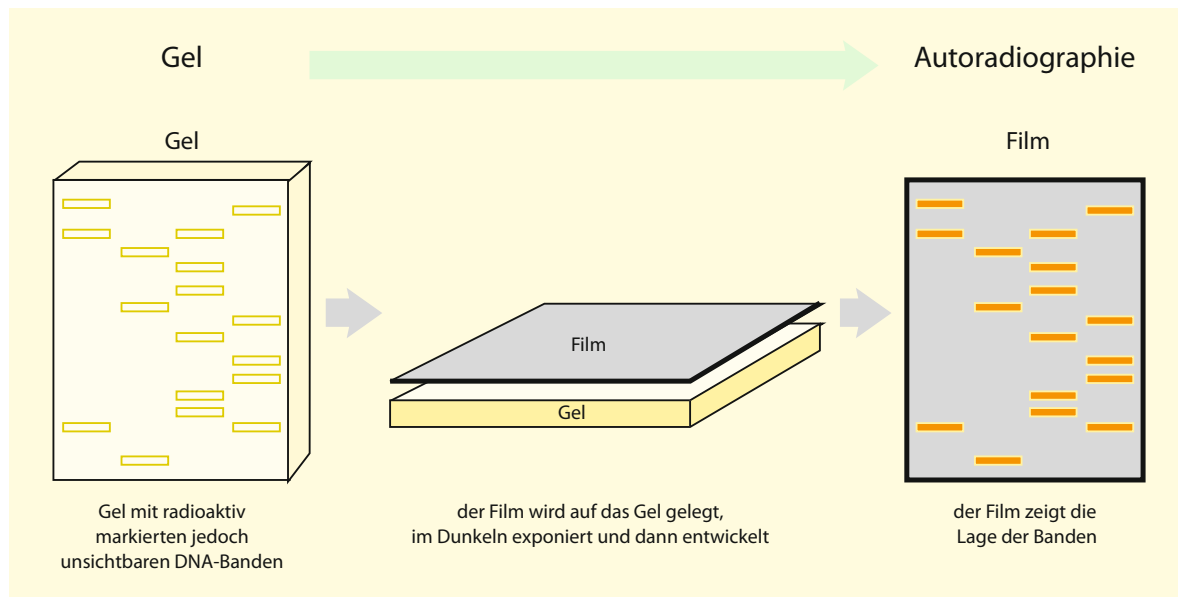
beim Phosphorthioat eines der Sauerstoffatome der Phosphatgruppe durch Schwefel ersetzt. Die meisten in Labors verwendeten Radionuklide sind kurzlebig. ^{32}P besitzt eine Halbwertszeit von 14 Tagen und bei ^{35}S sind es 68 Tage. Die Isotope zerfallen also schnell. Radioaktive DNA ist zwar nicht sichtbar, ein Röntgenfilm wird durch sie jedoch geschwärzt. Man bezeichnet radioaktive DNA als „**heiß**“, nichtmarkierte dagegen als „**kalt**“.

Die radioaktiven Nucleotidvorstufen können zu einer schnell wachsenden Bakterienkultur gegeben werden. Während der Replikation werden die Vorläufermoleküle in die neue DNA eingebaut (s. Kap. 4). Die DNA wird aus den Bakterien isoliert, über ein Gel aufgetrennt, und mithilfe der **Autoradiographie** lässt sich die Position der radioaktiv markierten DNA im Gel bestimmen (Abb. 3.6). Ist das Gel dünn wie die meisten Polyacrylamidgele, wird es unter Wärmezufuhr und im Vakuum getrocknet. Ist das Gel jedoch dick wie Agarosegele, dann wird die DNA mithilfe von Kapillarkräften auf eine Nylonmembran übertragen (s. Abb. 3.10). Auf das getrocknete Gel bzw. die Nylonmembran wird ein Röntgenfilm gelegt, der durch den radioaktiven Zerfall des Isotops in den Bereichen geschwärzt wird, die sich nahe der radioaktiven Markierung befinden. Mithilfe des

Films lässt sich die heiße DNA im Gel nachweisen. Eine Färbung mit Ethidiumbromid zeigt dagegen die Position der gesamten DNA, unabhängig davon, ob sie heiß oder kalt ist. Durch diese beiden Verfahren ist es möglich, DNA-Fragmente zu unterscheiden.

Radioaktive DNA lässt sich auch über **Szintillationszählung** nachweisen. Hierfür wird eine kleine Probe der radioaktiven DNA mit Szintillationsflüssigkeit gemischt. Beim Zerfall der radioaktiven Isotope wird eine β -Strahlung frei, wodurch die Szintillationsflüssigkeit angeregt und Licht emittiert wird. Der Szintillationszähler detektiert und zählt die Lichtblitze mithilfe einer Photozelle über einen bestimmten Zeitraum. Die Konzentration an radioaktiver DNA kann durch einen Vergleich mit bekannten Standards ermittelt werden. Die Szintillationszählung kann allerdings weder nichtmarkierte, kalte DNA nachweisen noch zwischen vielen Fragmenten markierter, heißer DNA unterscheiden; es wird ausschließlich die gesamte Radioaktivität in der Probe gemessen.

Während der Replikation werden radioaktive Isotope in die DNA eingebaut. Die Stärke der radioaktiven Markierung lässt sich mithilfe von Autoradiographie oder Szintillationszählung bestimmen.



3.6 Autoradiographie

Ein Gel, das radioaktive DNA (oder RNA) enthält, wird getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Beides wird in einer lichtundurchlässigen Filmkassette verschlossen. Nach einiger Zeit (Stunden oder Tagen) wird der Film entwickelt. Er zeigt an den Stellen, an denen sich im Gel die radioaktive DNA befunden hat, dunkle Banden.

Nachweis von Nucleinsäuren mithilfe von Fluoreszenz

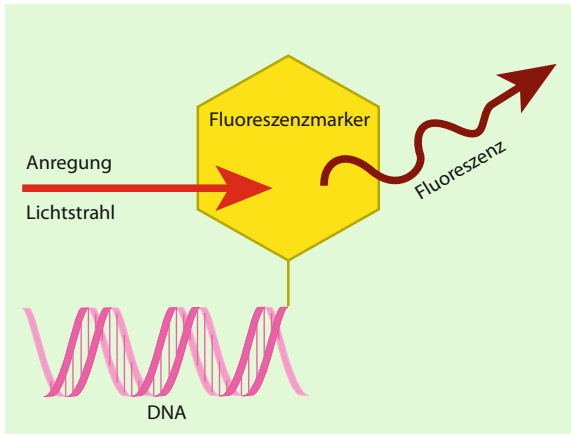
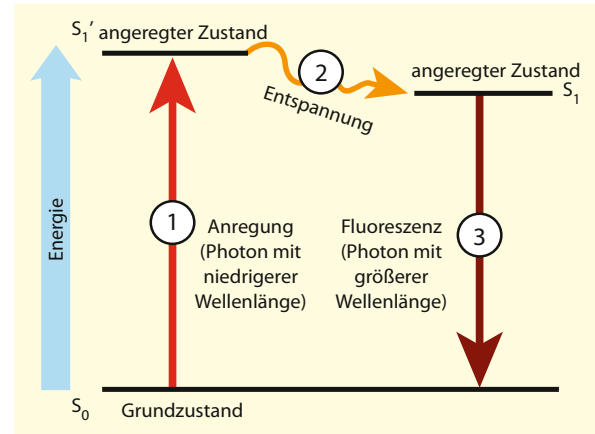
Autoradiographie hat ihre Vorteile, doch die Arbeit mit ihr und die Beseitigung des radioaktiven Abfalls ist aufwendig, sowohl finanziell als auch hinsichtlich des Umweltschutzes. Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nucleotiden ist für den Nachweis von DNA eine geeignetere Methode (Abb. 3.7). Die fluoreszierenden Markermoleküle absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, das Atome anregt und den Energiezustand der Markermoleküle verändert. Bei der Rückkehr dieser angeregten Moleküle in den Grundzustand emittieren die Moleküle ein Photon einer anderen (größeren) Wellenlänge. Das emittierte Photon wird über einen **Photodetektor** nachgewiesen. Es gibt viele verschiedene fluoreszierende Markermoleküle, und jedes emittiert Licht einer anderen Wellenlänge. Einige Photodetektorsysteme sind ausreichend sensitiv, um zwischen den unterschiedlichen Markern unterscheiden zu können. Tragen beispielsweise die verschiedenen Basen unterschiedliche Markierungen, kann ein solcher Detektor feststellen, um welche Base es sich handelt. Auf der Grundlage dieses Prinzips funktionieren

die meisten heutigen DNA-Sequenzierautomaten (s. Kap. 4).

Mithilfe von fluoreszenzmarkierten Nucleotiden lassen sich Fluoreszenzmarker während der Replikation in die DNA einbauen.

Chemische Markierung mit Biotin und Digoxigenin

Biotin ist ein Vitamin und Digoxigenin ein Steroid aus dem Fingerhut. Mithilfe dieser beiden Verbindungen ist es möglich, DNA nichtradioaktiv zu markieren und ohne kostspielige Photodetektoren nachzuweisen. Biotin oder Digoxigenin werden chemisch an Uracil gekoppelt; die DNA muss daher *in vitro*, wie in Kapitel 4 beschrieben, mit dem markierten Uracil anstatt mit Thymin synthetisiert werden. Für die Synthese notwendig sind eine einzelsträngige DNA-Matrize, die DNA-Polymerase, ein kurzer DNA-Primer und ein Gemisch aus dATP, dGTP, dCTP und dUTP, an das entweder Biotin oder Digoxigenin ge-

a Fluoreszenzmarkierung der DNA**b** Energiezustände bei der Fluoreszenz**3.7 Fluoreszenzmarkierung von DNA**

a Fluoreszenzmarkierung von DNA. Während der Synthese wird ein Nucleotid, an das ein Fluoreszenzmarker gebunden ist, am 3'-Ende der DNA eingebaut. Ein Photon regt das fluoreszierende Molekül an, das anschließend Licht einer größeren Wellenlänge abgibt. **b** Die Energiezustände bei Fluoreszenz. Das mit der DNA verknüpfte fluoreszierende Molekül hat drei unterschiedliche Energiezustände, S_0 , S_1' und S_1 . Der S_0 - oder Grundzustand ist der Zustand vor der Bestrahlung mit Licht. Trifft ein Photon auf das fluoreszierende Molekül, dann absorbiert das Molekül die Energie und erreicht den ersten angeregten Zustand S_1' . Zwischen S_1' und S_1 entspannt das Molekül leicht, doch es emittiert kein Licht. Schließlich setzt der energiereiche Zustand seine Energie durch Emission eines Photons größerer Wellenlänge frei. Dadurch kehrt das Markermolekül in seinen Grundzustand zurück.

koppelt ist. Die DNA-Polymerase synthetisiert den zur Matrize komplementären Strang und baut dabei das biotin- bzw. digoxigeningekoppelte Uracil gegenüber von allen Adeninen ein.

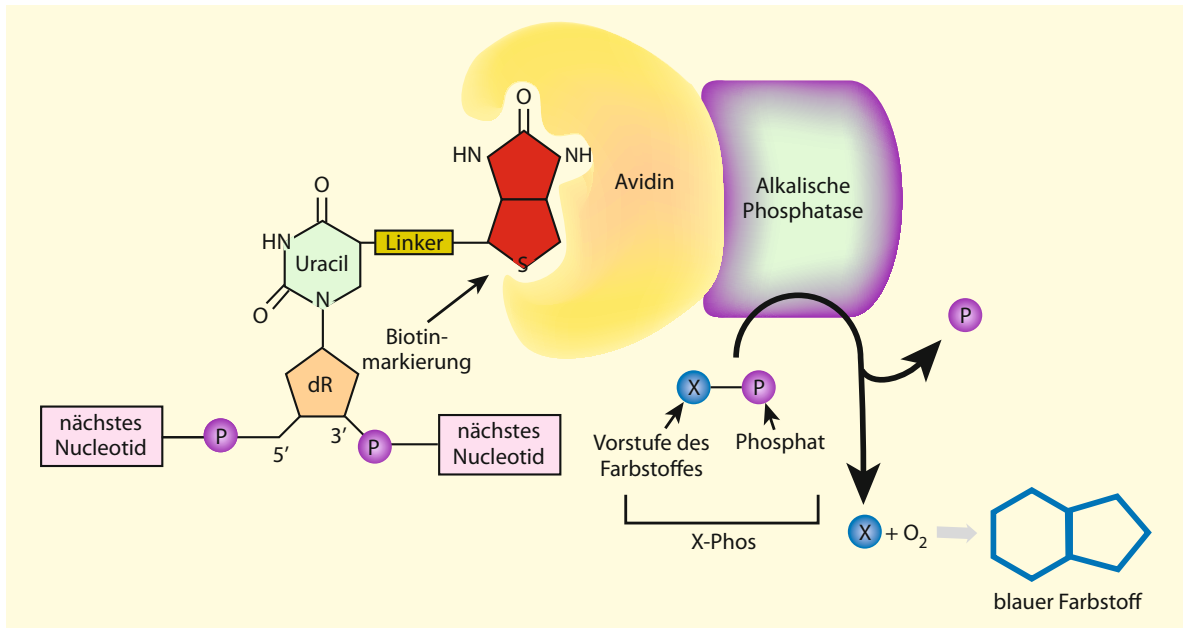
Die markierte DNA wird in einem zweistufigen Verfahren sichtbar gemacht (Abb. 3.8). Wurde Biotin als Marker verwendet, dann bindet zunächst **Avidin** an das Markermolekül, bei Digoxigenin ist es ein spezifischer Antikörper, der an das Digoxigeninmolekül bindet. Sowohl Avidin als auch der Antikörper sind mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert, ein Enzym, das von Substraten Phosphat abspaltet. Als Substrat für die **Alkalische Phosphatase** dient eine Reihe verschiedener chromogener Moleküle, von denen eines **X-Phos** ist. Hat das Enzym die Phosphatgruppe von X-Phos entfernt, reagiert das entstandene Produkt mit Sauerstoff und es entsteht ein Präzipitat, dessen blaue Farbe die Position der markierten DNA anzeigt. Ein weiteres Substrat der Alkalischen Phosphatase ist **Lumi-Phos**, ein Chemilumineszenzfarbstoff, der sichtbares Licht abstrahlt, wenn ein Phosphatmolekül entfernt wird. Wie bei der Autoradiographie wird auch hier ein Röntgenfilm über die mit Lumi-Phos behandelte, markierte DNA gelegt. Nach der Filmentwicklung erscheinen

dort dunkle Banden, wo sich die markierte DNA befunden hat.

Biotin- und digoxigeninmarkierte DNA wird mithilfe von Avidin bzw. einem Antikörper gegen Digoxigenin nachgewiesen. Avidin bzw. der Antikörper sind mit der Alkalischen Phosphatase konjugiert, die mit X-Phos zu einem blauen Präzipitat oder mit Lumi-Phos unter Lichtemission reagiert. Jede der Methoden ist geeignet, um markierte DNA nachzuweisen, zu quantifizieren oder zu lokalisieren.

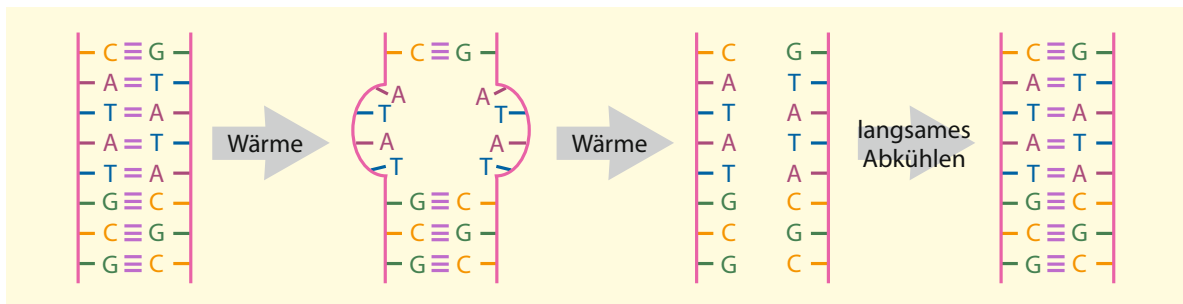
Komplementäre Stränge trennen sich und lagern sich wieder zusammen

Die komplementären, antiparallel verlaufenden DNA-Stränge bilden ein Molekül, dessen Einzelstränge sich trennen (**schmelzen**) und wieder **aneinanderlagern** können (Abb. 3.9). Die Wasserstoffbrücken, die beide Stränge zusammenhalten, sind relativ schwach. Das



3.8 Markierung und Nachweis von DNA mit Biotin

DNA kann *in vitro* mit einem Uracilnucleotid synthetisiert werden, an das ein Biotinmolekül gekoppelt ist. Das Biotin lässt sich durch die Zugabe eines Avidin/Alkalische Phosphatase-Konjugates sichtbar machen. Avidin bindet an Biotin und die Alkalische Phosphatase entfernt Phosphat von X-Phos (oder anderen Substraten), wodurch ein blauer Farbstoff entsteht.



3.9 Durch Wärmezufuhr schmilzt DNA, in der Kälte lagert sie sich wieder zusammen

Wasserstoffbrücken lösen sich durch Wärmezufuhr leicht, wobei die beiden Stränge getrennt werden, aber intakt bleiben. Kehrt die Temperatur wieder auf den Normalwert zurück, bilden sich die Wasserstoffbrücken wieder.

Erwärmen einer DNA-Probe löst diese Bindungen, wodurch zwei komplementäre Einzelstränge entstehen. Wird die DNA-Probe langsam wieder abgekühlt, lagern sich beide Stränge erneut aneinander, sodass G wie zuvor mit C paart und A mit T.

Der Anteil an G-C-Basenpaaren beeinflusst die Temperatur, die erforderlich ist, um die DNA-Doppelhelix zu schmelzen. G-C-Basenpaare haben drei Wasserstoffbrücken, die geschmolzen werden müssen, bei A-T sind es nur zwei. Um DNA mit einem

höheren Anteil an G-C-Basenpaaren zu trennen, ist daher mehr Energie erforderlich als bei DNA mit einem geringeren GC-Anteil. Das **GC-Verhältnis** wird wie folgt definiert:

$$\frac{G + C}{A + G + C + T} \times 100\%$$

DNA-Stränge trennen und wieder verbinden zu können ist für die Zellfunktion wichtig und wird auch für die Biotechnologie genutzt. Replikation (s. Kap. 4)

und Transkription (s. Kap. 2) beruhen auf einer Trennung der DNA-Doppelhelix. Viele Methoden der Molekularbiologie, angefangen von der PCR bis hin zum Screening von Bibliotheken, machen sich die komplementäre Struktur der DNA-Stränge zunutze.

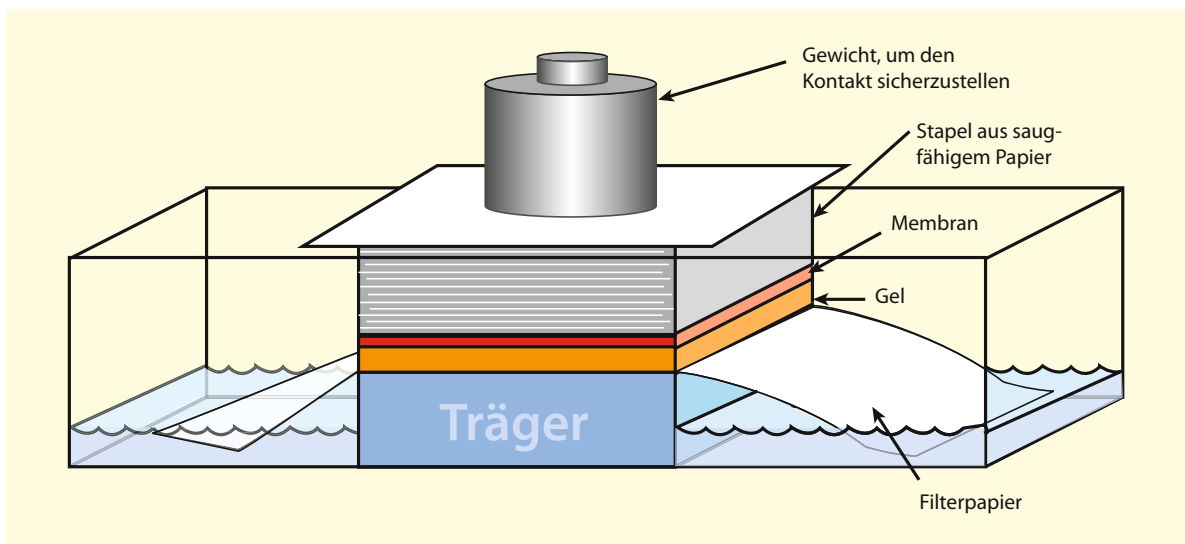
Die komplementären DNA-Stränge lassen sich durch Wärmezufuhr leicht trennen, sie lagern sich spontan wieder zusammen, wenn das DNA-Gemisch abkühlt.

Hybridisierung von DNA oder RNA in Southern- und Northern-Blots

Werden zwei verschiedene DNA-Doppelhelices geschmolzen, können die beiden Einzelstränge vor dem Abkühlen und der Aneinanderlagerung vermischt werden. Haben die beiden ursprünglichen DNA-Moleküle ähnliche Sequenzen, dann ist es möglich, dass sich ein Einzelstrang des einen DNA-Moleküls an den entgegengesetzten Strang des anderen DNA-Moleküls lagert. Diesen Vorgang bezeichnet man als

Hybridisierung. Sie kann eingesetzt werden, um die Ähnlichkeit von Sequenzen zweier verschiedener DNA- bzw. RNA-Proben festzustellen. In Hybridisierungsexperimenten bezieht sich der Begriff „**Sonden-molekül**“ auf eine bekannte DNA-Sequenz oder ein Gen, das eingesetzt wird, um die Probe bzw. die **Ziel-DNA** auf ähnliche Sequenzen zu testen.

Southern-Blots werden eingesetzt, um zu bestimmen, wie sehr die DNA-Sequenzen einer Quelle den DNA-Sequenzen einer anderen Quelle ähneln. Durch Vermischen der DNA-Moleküle aus beiden Quellen entstehen dabei Hybrid-DNA-Moleküle. Ein Southern-Blot besteht aus zwei Komponenten: der Sonden-sequenz (z.B. ein bekanntes Gen aus einem Organismus) und der Ziel-DNA (häufig aus einem anderen Organismus). Ein typischer Southern-Blot beginnt mit der Isolierung der Ziel-DNA aus dem einen Organismus. Es schließt sich eine Spaltung mit einem Restriktionsenzym an, wodurch Fragmente mit einer Größe von 500 bis 10000 bp entstehen, gefolgt von der Auftrennung der Fragmente mithilfe der Gelelektrophorese. Die getrennten Fragmente sind doppelsträngig, doch wenn das Gel in einer starken Säure inkubiert wird, trennt sich die DNA in ihre Einzelstränge. Durch Kapillarkräfte lassen sich die Einzelstränge auf eine Membran übertragen (Blotting; Abb. 3.10). Einmal an die Membran gebunden, bleibt die DNA dann einzelsträngig.



3.10 DNA wird durch Kapillarkräfte auf eine Membran übertragen

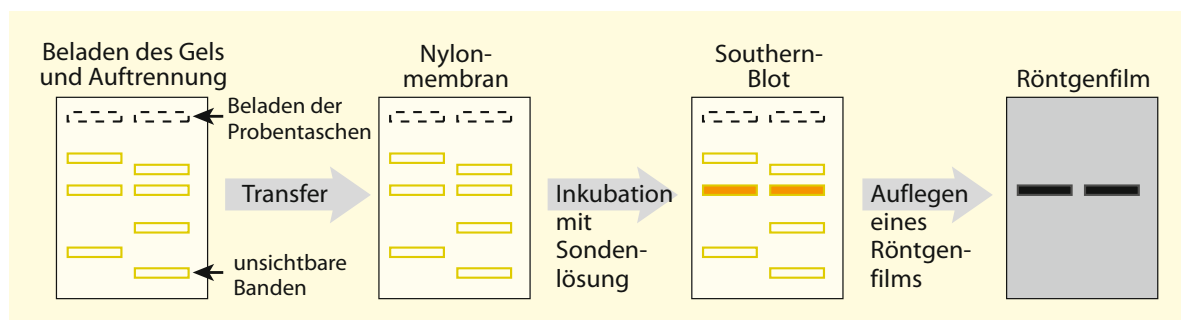
Aus einem Gel wird einzelsträngige DNA auf eine Membran übertragen. Das Filterpapier saugt den Puffer aus dem Tank an, der Puffer strömt durch Gel und Membran bis in einen Stapel saugfähiges Papier. Mit dem Pufferstrom bewegt sich auch die einzelsträngige DNA aus dem Gel und heftet sich an die Membran. Das Gewicht stellt den Kontakt zwischen Membran und Gel sicher und unterstützt das Ansaugen des Puffers aus dem Tank.

Als nächstes wird die Sonde hergestellt. Zuerst muss eine bekannte Sequenz oder ein Gen isoliert und markiert werden (s. oben). Die Identifizierung von Genen ist viel einfacher geworden, seitdem viele Genome vollständig sequenziert sind. So ist es mittlerweile kein Problem mehr, die Kopie eines menschlichen Gens zu erzeugen, um sie als Sonde für die Suche nach ähnlichen Genen in anderen Organismen einzusetzen. Auch lassen sich die Sequenzdaten zur Herstellung einer Oligonucleotidsonde verwenden, die nur das interessierende Gen erkennt (s. Kap. 4). Kommt die Sequenz des Oligonucleotids häufig vor, dann ergeben sich viele Bindungsstellen. Die Oligonucleotidsonden müssen daher ausreichend lang sein, damit sie nur mit einer (oder sehr wenigen) Zielsequenz(en) im Zielgenom hybridisieren. Die DNA-Sonden für einen Southern-Blot werden radioaktiv, mit Biotin oder mit Digoxigenin markiert (s. oben). Die markierte DNA wird anschließend bei hohen Temperaturen denaturiert, sodass Einzelstränge entstehen. (Synthetische Oligonucleotide sind bereits einzelsträngig.)

Für den Southern-Blot wird die einzelsträngige Sonde mit der Membran inkubiert, auf der die einzelsträngigen DNA-Zielsequenzen fixiert sind (Abb. 3.11). Die Inkubation erfolgt bei einer Temperatur, bei der sich Hybrid-DNA-Stränge zwar bilden können, die Anzahl von Fehlpaarungen aber gering ist. Abhängig davon, wie spezifisch eine solche Hybridisierung sein soll, kann die Temperatur und daher auch das Ausmaß der Fehlpaarungen variiert werden. Wurde die Sonde radioaktiv markiert, wird anschließend ein Röntgenfilm auf die Mem-

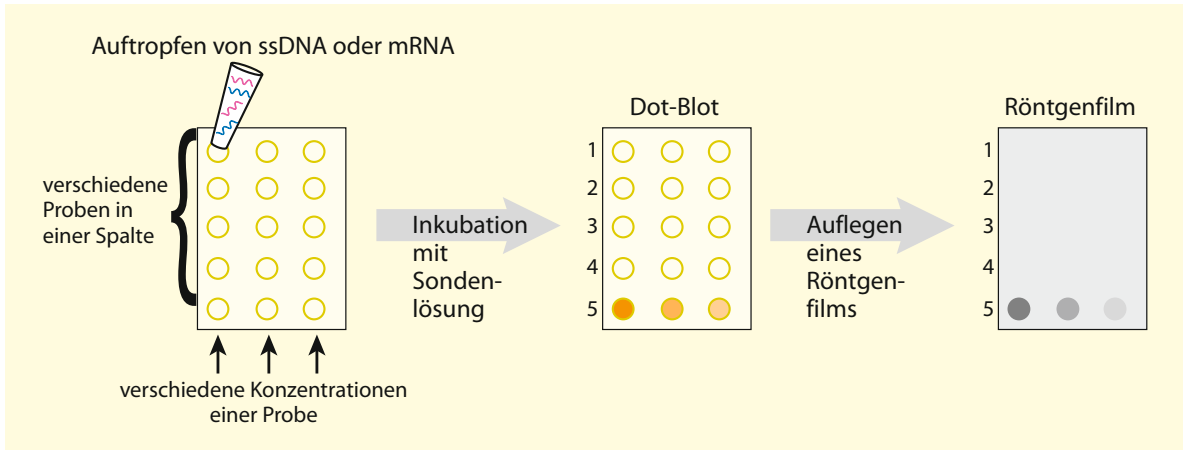
bran gelegt. Wurde die Sonde dagegen mit Biotin oder Digoxigenin markiert, muss die Membran vor dem Auflegen des Films zunächst mit einem Chemilumineszenzsubstrat behandelt werden. Schwarze Banden auf dem Film repräsentieren die Stellen, an denen Fragmente mit einer zur Sonde ähnlichen Sequenz auf der Membran fixiert sind. Biotin- oder Digoxigeninmarkierungen können auch durch eine Behandlung der Membran mit einem chromogenen Substrat sichtbar gemacht werden. In diesem Fall bilden sich direkt auf der Membran an den Stellen mit sondenähnlichen Sequenzen blaue Banden.

Auch **Northern-Blots** beruhen auf der Hybridisierung von Nucleinsäuren. In einem Northern-Blot ist jedoch RNA als Zielmolekül auf der Membran fixiert. Die Sonde für einen Northern-Blot ist wie bei einem Southern-Blot entweder ein Fragment eines Gens oder ein Oligonucleotid. Die Ziel-RNA ist in der Regel mRNA. In Eukaryoten ist das Screening von mRNA effizienter, weil genomische DNA viele Introns besitzt, die mit der Sonde in Wechselwirkung treten könnten. Außerdem ist mRNA bereits einzelsträngig, sodass das Agarosegel vor dem Blotting nicht mit einer starken Säure behandelt werden muss. Wie bei einem Southern-Blot beginnt ein Northern-Blot mit der elektrophoretischen Auftrennung der mRNA nach ihrer Größe. Die mRNA wird auf eine Nylonmembran übertragen und diese dann mit einer einzelsträngigen, markierten Sonde inkubiert. Die Sonde kann ebenfalls mit Biotin, Digoxigenin oder radioaktiv markiert sein. Die Membran wird weiterbehandelt und dann ein Röntgenfilm aufgelegt oder ein chromogenes Substrat zugegeben.



3.11 Durch die Bildung von Hybrid-DNA-Molekülen im Southern-Blot lassen sich ähnliche Sequenzen nachweisen

Für das Southern-Blotting muss die Ziel-DNA in kleine Fragmente geschnitten und diese in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die Fragmente werden chemisch denaturiert, damit Einzelstränge entstehen, die anschließend auf eine Nylonmembran übertragen werden. Eine ebenfalls einzelsträngige radioaktive Sonde wird mit der Membran bei einer Temperatur inkubiert, die die Bildung von Hybriden (mit einigen wenigen Fehlpaarungen) erlaubt. Die Position der radioaktiven Hybridmoleküle wird durch das Auflegen eines Röntgenfilms und die anschließende Entwicklung sichtbar gemacht.



3.12 Dot-Blot

Bei einem Dot-Blot werden die DNA- oder die RNA-Proben punktförmig, häufig auch in verschiedenen Konzentrationen direkt nebeneinander, auf eine Nylonmembran aufgetragen. Die Membran wird mit der radioaktiven Sonde inkubiert und dann ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Proben, die zur Sonde komplementäre DNA oder RNA enthalten, sind auf dem Film als schwarzer Punkt sichtbar.

Eine Variante dieser Hybridisierungsmethode ist der **Dot-Blot** (Abb. 3.12). Hier werden die Komponenten in der Probe nicht nach ihrer Größe aufgetrennt, sondern DNA oder mRNA punktförmig auf die Nylonmembran aufgetragen. Wie bei einem Southern-Blot muss eine DNA-Probe einzelsträngig gemacht werden, bevor sie auf der Membran fixiert wird. Auch die Dot-Blot-Membran wird mit der markierten Sonde inkubiert. Es folgen die üblichen Schritte bis zum Auflegen des Films. Enthält die fixierte DNA oder mRNA eine sondenähnliche Sequenz, dann wird der Film an dieser Stelle geschwärzt. Dot-Blots sind schnell durchführbar und mit ihrer Hilfe lässt sich vor einer ausführlicheren Analyse mittels Southern- oder Northern-Blot leicht ermitteln, ob die Probe eine sondenähnliche Sequenz enthält. Ein weiterer Vorteil von Dot-Blots ist, dass viele Proben gleichzeitig, aber mit einem geringeren Platzbedarf analysiert werden können.

In Southern-Blots bilden sich Hybrid-DNA-Moleküle, die anzeigen, ob sich in einer DNA-Probe eine zu einer anderen DNA-Probe homologe Sequenz befindet.

Mithilfe von Northern-Blots lässt sich ermitteln, ob eine mRNA-Probe eine zu einer DNA-Probe homologe Sequenz besitzt. Bei großen Genomen ist die Verwendung von mRNA effizienter, weil die Introns bereits entfernt sind.

Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

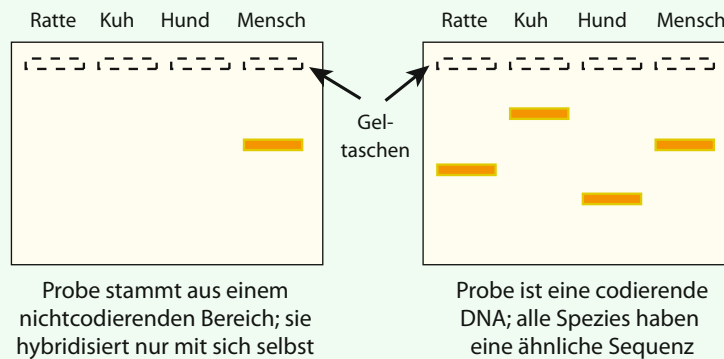
Die bislang besprochenen Hybridisierungsmethoden beruhen auf gereinigter DNA oder RNA, die mithilfe eines Agarosegels nach Größe aufgetrennt wurden. Bei der **Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)** wird die Sonde jedoch mit der in der Zelle vorhandenen DNA bzw. RNA inkubiert. Wie bereits beschrieben ist die Sonde ein kleines DNA-Fragment, das z.B. mit Fluoreszenzmarkern markiert wurde, um es sichtbar zu machen. Die Ziel-DNA oder -RNA ist in der Zelle lokalisiert, was eine spezielle Vorbereitung erfordert. Die Zielzellen können Ultradünnschnitte eines Gewebes aus einem bestimmten Organismus sein. In einer Biopsie wird z.B. eine Gewebeprobe für die Untersuchung entnommen. Dieses Gewebe wird fixiert und dann in sehr dünne Scheiben geschnitten, die unter dem Mikroskop untersucht werden. Diese Schnitte lassen sich auch einsetzen, um mithilfe von FISH die Anwesenheit eines Gens zu überprüfen. Säuger- oder Insektenzellkulturen können ebenfalls als Zielzellen für FISH dienen (s. Kap. 1). Auch kann Blut abgenommen und die weißen Blutkörperchen isoliert werden. (Anmerkung: Rote Blutkörperchen enthalten keinen Zellkern und daher keine DNA.) Chromosomen aus weißen Blutkörperchen können

Exkurs 3.2

Ein Zoo-Blot vergleicht Sequenzen zwischen unterschiedlichen Spezies

Southern-Blots werden für eine Reihe von Experimenten verwendet. Wird DNA aus verschiedenen Organismen nach einer Sequenz durchsucht, die einer Sondensequenz des Menschen ähnlich ist, bezeichnet man den Southern-Blot als **Zoo-Blot**. Je enger verwandt die Organismen sind, umso wahrscheinlicher ist es, eine ähnliche Sequenz zu finden. Stammt die menschliche Sequenz z.B. von einem Hämoglobingen, dann zeigen die Ergebnisse ähnliche Sequenzen beim Schimpanse, Pferd und Schwein, nicht

jedoch bei Hefe oder Bakterien. Eine der interessantesten Anwendungen von Zoo-Blots ist, nichtcodierende DNA mit codierender DNA zu testen (Abb.). Die Sequenzen nichtcodierender DNA verändern sich im Vergleich zu codierenden schnell. Daher stammt eine Sonde, die genomische DNA aus vielen verschiedenen, aber verwandten Organismen nachweisen soll, in der Regel aus einem codierenden Bereich. Ist die Sondensequenz dagegen eine nichtcodierende DNA, dann hybridisiert sie nur selten.



Zoo-Blot

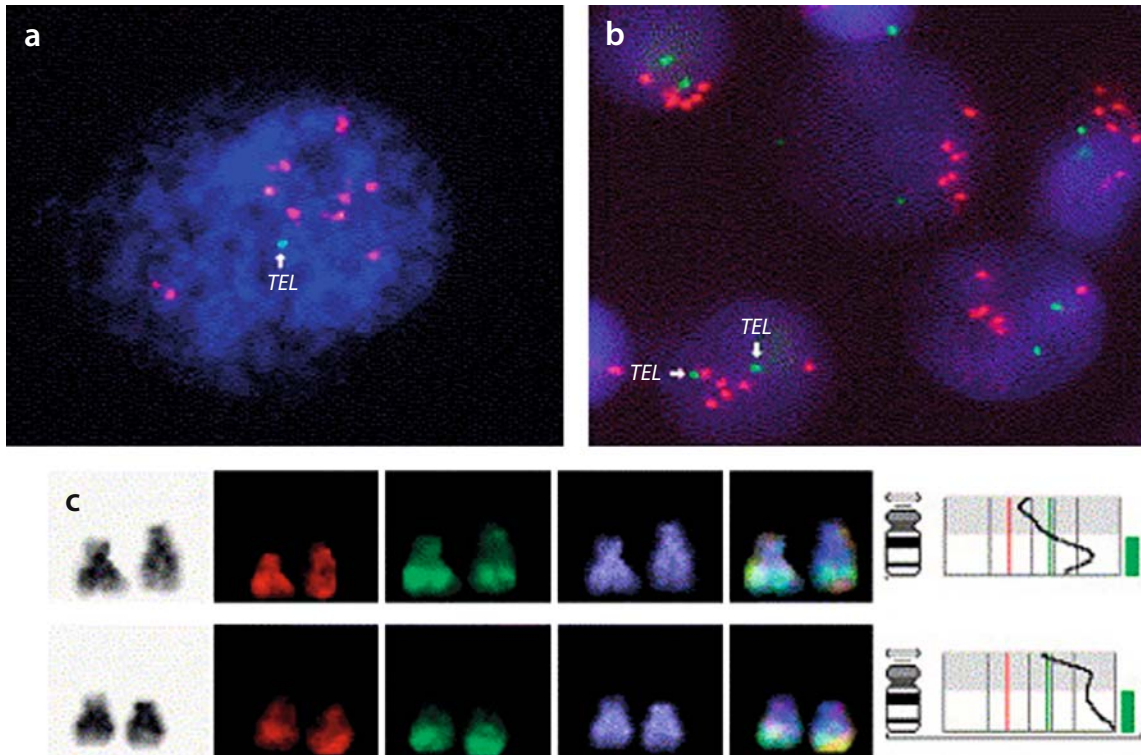
Eine spezielle Form des Southern-Blotting ist das Zoo-Blotting, das auch eingesetzt wird, um codierende von nichtcodierenden DNA-Bereichen zu unterscheiden. Die Ziel-DNA umfasst mehrere Proben genomischer DNA aus verschiedenen Tieren, daher die Bezeichnung „Zoo“. Die Sonde ist ein Segment menschlicher DNA, das möglicherweise aus einem codierenden Bereich stammt. Da die Basensequenzen einer nichtcodierenden DNA im Vergleich zu denen eines codierenden Bereichs relativ schnell mutieren, stammt eine Sonde, die an genomische DNA vieler unterschiedlicher Organismen bindet, in der Regel aus einer codierenden Region. Auf der linken Seite hybridisiert die Sonde nur mit der menschlichen DNA; daher stammt sie wahrscheinlich aus einer nichtcodierenden Region. Im Beispiel rechts bindet die Sonde an ähnliche Sequenzen aus anderen Tieren; daher stammt sie wahrscheinlich aus einem codierenden Bereich.

sowohl in der Interphase, also ausgebreitet, vorliegen, als auch in der Metaphase, in der sie stark kondensiert sind.

Unabhängig davon, ob die Ziel-DNA aus Blut, Zellkulturen oder frischen Gewebeschnitten stammt, müssen die Zellen erhitzt werden, um die DNA zu denaturieren. Ist jedoch RNA das Zielmolekül, dann ist eine Denaturierung nicht erforderlich. Die fluoreszenzmarkierte Sonde hybridisiert mit komplementären DNA- bzw. RNA-Sequenzen, und wenn die Zellen mit einer geeigneten Wellenlänge bestrahlt werden, lässt sich die Position der Sonde auf dem

Chromosom anhand der Fluoreszenz ermitteln. Abbildung 3.13 zeigt eine FISH-Analyse des *RUNX1*-Gens. Bei bestimmten Formen der akuten lymphatischen Leukämie beim Menschen tritt dieses Gen wegen einer Polysomie (d.h. vielfache Kopien) des Chromosoms 21 mehrfach auf.

FISH ist eine Methode, bei der Zellen, deren DNA durch Wärme denaturiert wurde, mit einer markierten Sonde inkubiert werden. Die Sonde hybridisiert mit homologen Sequenzen auf den Chromosomen.



3.13 Genlokalisierung auf Chromosomen mithilfe von FISH

a und **b** FISH von Zellkernen in der Interphase mit einer zweifarbigen DNA-Sonde, *RUNX1* (= *AML1*) ist rot dargestellt und *TEL* (Telomerase) grün. **a** Patient 1 zeigt viele *RUNX1*-Signale, doch fehlt ein *TEL*-Signal (Pfeil). **b** Patient 2 hat ebenfalls zusätzliche Kopien von *RUNX1*, aber zwei normale *TEL*-Signale (Pfeile). **c** Eine partielle GTG-Bänderung und das CGH-Profil von Chromosom 21 beider Patienten zeigen, dass der Schwellenwert für die Kopienzahl für die 21q22-Region, in der *RUNX1* liegt, überschritten wird. Aus: Garcia-Casado et al. (2006) High level amplification of the *RUNX1* gene in two cases of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 170: 171–174. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.

Exkurs 3.3

Die Entdeckung rekombinanter DNA

Im Jahr 1972 trafen sich zwei Wissenschaftler bei einer Konferenz auf Hawaii, um über Plasmide, die kleinen extrachromosomalen DNA-Ringe in Bakterien, zu diskutieren. Herbert W. Boyer, PhD, war Fakultätsmitglied an der University of California, San Diego, und erforschte damals Restriktions- und Modifikationsenzyme. Er hatte soeben seine an *E. coli* gewonnenen Ergebnisse präsentiert. Stanley N. Cohen, MD, war Fakultätsmitglied in Stanford und widmete sich in seinen Forschungen der Frage, wie Plasmide Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika vermitteln. In seinem Labor war die Methode der Transformation von *E. coli* mithilfe von Calciumchlorid, das die Zellwand durchlässig macht, sehr gut etabliert. Nach den Vorträgen trafen sich die beiden Forscher und sprachen über ihre Ideen.

Sie isolierten unterschiedliche DNA-Fragmente aus Tieren, anderen Bakterien und Viren und ligierten sie

mithilfe von Restriktionsenzymen in ein kleines Plasmid aus *E. coli*. Dieses war die erste jemals hergestellte rekombinante DNA. Schließlich schleusten sie das gentechnisch veränderte Plasmid wieder in *E. coli* ein. Die Zellen exprimierten die normalen Gene auf dem Plasmid wie auch die künstlich in das Plasmid eingefügten. Dies revolutionierte die Gentechnik, und seitdem hat jedes biotechnologisch arbeitende Labor mindestens eine Variante dieses Verfahrens angewendet. Boyer und Cohen meldeten ein Patent für die DNA-Rekombinationstechnologie an. Und tatsächlich gründete Boyer zusammen mit Robert Swanson, einem Investor, die Firma Genentech. Genentech ist eines der ersten Biotechnologieunternehmen in den Vereinigten Staaten und produzierte unter der Leitung von Boyer und Swanson humanes Somatostatin in *E. coli*.

Allgemeine Merkmale von Klonierungsvektoren

Klonierungsvektoren sind spezialisierte Plasmide (oder andere genetische Elemente), die ein Stück Fremd-DNA enthalten, welches weiter untersucht oder verändert werden soll. Anzahl und Varianten der für die Klonierung verfügbaren Plasmide haben immer weiter zugenommen. Außerdem werden heutzutage andere DNA-Elemente wie Viren und künstliche Chromosomen eingesetzt. Ist ein DNA-Fragment kloniert und in einen geeigneten Vektor eingefügt, lassen sich große Mengen an DNA herstellen – deren Sequenz kann bestimmt und die enthaltenen Gene können in anderen Organismen exprimiert werden. Die Untersuchung humaner Gene im Menschen selbst ist aufgrund der ethischen Beschränkungen nahezu unmöglich. Eine Expression dieser Gene in Bakterien liefert hingegen nützliche Informationen, die sich häufig auf den Menschen übertragen lassen. Die moderne Biotechnologie hängt von der Fähigkeit ab, Fremdgene in Modellorganismen exprimieren zu können. Bevor wir betrachten, wie ein Gen kloniert wird, behandeln wir die Eigenschaften von Vektoren.

Nützliche Eigenschaften von Klonierungsvektoren

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von spezialisierten Vektoren, wobei die meisten der heutigen Plasmide folgende Eigenschaften besitzen. Der Umgang mit ihnen wird dadurch stark vereinfacht:

- Geringe Größe, sodass sie sich einfach manipulieren lassen, wenn sie einmal isoliert sind,
- Leicht von einer Zelle auf eine andere zu übertragen (in der Regel durch Transformation),
- Leicht aus dem Wirtsorganismus zu isolieren,
- Leicht nachzuweisen und selektierbar,
- Viele Kopien, was hilfreich ist, wenn eine große Menge an DNA notwendig ist,
- Methoden, um die Anwesenheit von integrierter Fremd-DNA nachzuweisen (z.B. α -Komplementation bzw. Blau-Weiß-Selektion).

Die meisten bakteriellen Plasmide erfüllen die ersten drei Voraussetzungen. Aufgrund der folgenden wichtigen Eigenschaft von Klonierungsvektoren kann ihre Anwesenheit im Wirtsorganismus leicht nachgewiesen werden. Klonierungsplasmide aus Bakterien tra-

gen häufig Gene für Antibiotikaresistenz, die die Bakterien resistent gegenüber bestimmten Antibiotika machen. Sind die Bakterien dem Antibiotikum ausgesetzt, dann überleben nur solche, die über eine auf dem Plasmid codierte Resistenz gegenüber dem Antibiotikum verfügen. Auch andere Merkmale werden genutzt, um die Anwesenheit von Plasmiden zu kontrollieren. Vektoren, die von dem 2- μ m-Plasmid der Hefe abstammen, besitzen häufig Gene für essenzielle Aminosäuren wie Leucin. Ist das korrespondierende Gen im Wirtstamm der Hefe defekt, können Hefezellen, denen das Plasmid fehlt, auf einem Medium ohne die Aminosäure nicht wachsen.

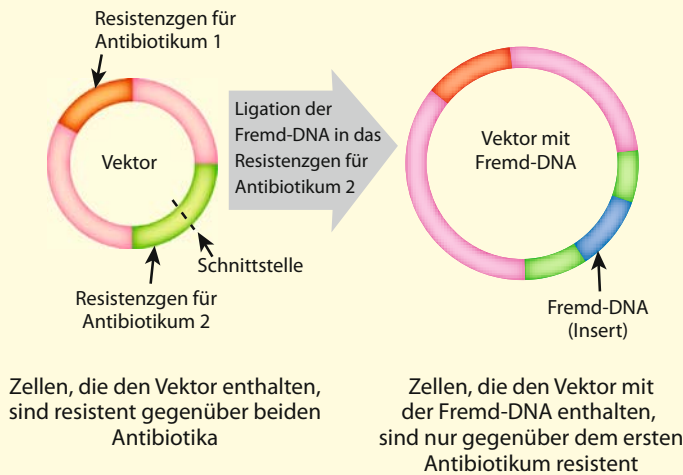
Plasmide variieren in ihrer **Kopienzahl**. Von einigen gibt es nur eine oder einige wenige Kopien in der Wirtszelle, bei anderen sind es dagegen viele. Solche Plasmide mit vielfachen Kopien sind allgemein nützlicher, da die Menge an Plasmid-DNA größer ist, wodurch sie sich leichter isolieren und reinigen lassen. Die Art des Replikationsursprunges bestimmt die Kopienzahl, da dieser Bereich auf dem Plasmid dafür ausschlaggebend ist, wie häufig die DNA-Polymerase bindet und die Replikation induziert.

Die meisten Klonierungsvektoren haben viele nur einmal vorkommende Schnittstellen für Restriktionsenzyme. In der Regel liegen diese Stellen in einem Bereich, der als **Polylinker** oder **multiple Klonierungsstelle** (engl. *multiple cloning site*, MCS) bezeichnet wird. Klonierungsvektoren lassen sich dadurch an einer Stelle öffnen, ohne eines der für die Replikation des Vektors notwendigen Gene zu zerstören. Fremd-DNA-Fragmente werden mit Enzymen geschnitten, deren Schnittstellen auch in der MCS zu finden sind. Werden beide Fraktionen gemischt, dann verbindet eine Ligase Vektor und Fremd-DNA. Auch können spezifische Restriktionsschnittstellen über PCR-Primer oder synthetische DNA-Oligomere hinzugefügt werden (s. Kap. 4).

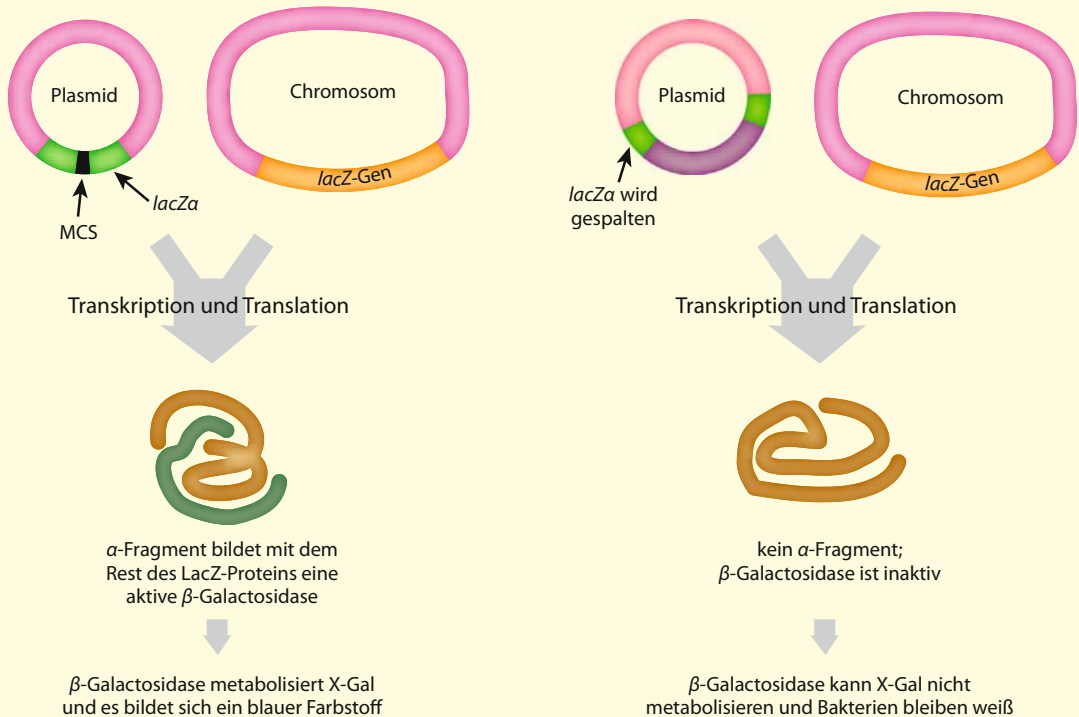
Bei einigen Vektoren lässt sich feststellen, ob sie eine Fremd-DNA enthalten oder nicht. Die einfachste Möglichkeit ist die **Insertionsinaktivierung** eines Gens für Antibiotikaresistenz (Abb. 3.14). In diesem Fall besitzt der Vektor zwei verschiedene Resistenzgene. Die Fremd-DNA wird in eines dieser Gene kloniert, wodurch das Wirtsbakterium für das eine Antibiotikum resistent ist, für das andere jedoch nicht.

Eine Alternative stellt die **α -Komplementation** oder Blau-Weiß-Selektion dar (s. Abb. 3.14). Der Vektor besitzt ein kurzes Stück des Gens für β -Galactosidase (das α -Fragment), und das bakterielle Chromosom trägt den Rest des Gens. Die Proteine, die aus beiden Fragmenten entstehen, sind Untereinheiten,

a Insertionsinaktivierung



b α -Komplementation



3.14 Nachweis von klonierter Fremd-DNA in Plasmiden

a Insertionsinaktivierung. Zellen mit eingefügter Fremd-DNA werden empfindlich für das zweite Antibiotikum, Zellen ohne eine solche Fremd-DNA bleiben resistent. **b** α -Komplementation. α -Komplementation bezieht sich darauf, dass von der β -Galactosidase zwei Proteinfragmente exprimiert werden können, die sich zu einem funktionellen Protein zusammenlagern. In Zellen ohne klonierte Fremd-DNA im Plasmid ist die β -Galactosidase aktiv und spaltet X-Gal zu einem blauen Farbstoff. In Zellen mit klonierter Fremd-DNA wird das α -Fragment nicht synthetisiert, und die β -Galactosidase ist inaktiv. Diese Zellen bleiben auf X-Gal-haltigem Medium weiß.

die sich zu einer funktionellen β -Galactosidase zusammenlagern. Wird DNA in das auf dem Plasmid lokalisierte Gen kloniert, dann wird die plasmidcodierte Untereinheit nicht synthetisiert und es entsteht keine funktionelle β -Galactosidase. Wird die β -Galactosidase hingegen exprimiert, dann können die Bakterien das Substrat X-Gal abbauen, und das Abbauprodukt färbt die Bakterienkolonien blau. Wurde jedoch ein DNA-Stück in das Gen des α -Fragments kloniert, dann sind die Bakterien nicht in der Lage, X-Gal zu spalten, und die Kolonien bleiben weiß.

Ist ein geeigneter Vektor für das interessierende Gen oder eine andere Fremd-DNA gefunden, werden die beiden Elemente zu einem **Konstrukt** ligiert. Dieser Begriff bezeichnet jedes rekombinante DNA-Molekül, das gentechnisch zusammengesetzt wurde. Werden Vektor und Fremd-DNA mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten, dann haben die beiden Moleküle komplementäre Enden und es ist nur eine Ligase erforderlich, um sie miteinander zu verbinden. Um nichtkompatible Enden kompatibel zu machen, gibt es verschiedene Methoden. Manchmal werden kurze Oligonucleotide synthetisiert und an die Enden der Fremd-DNA angefügt, um diese mit dem Vektor kompatibel zu machen. Diese kurzen Oligonucleotide bezeichnet man als **Linker**; sie staten die Enden des DNA-Fragments mit einer oder einigen wenigen neuen Restriktionsschnittstellen aus.

Klonierungsvektoren haben eine multiple Klonierungsstelle mit vielen singulären Restriktionsschnittstellen. Sie tragen Gene für Antibiotikaresistenz, durch die das Bakterium in Anwesenheit eines Antibiotikums wachsen kann, und sie bieten die Möglichkeit für den Nachweis von Fremd-DNA im Vektor mithilfe der α -Komplementation.

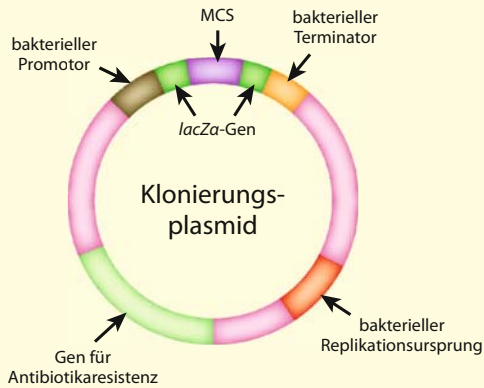
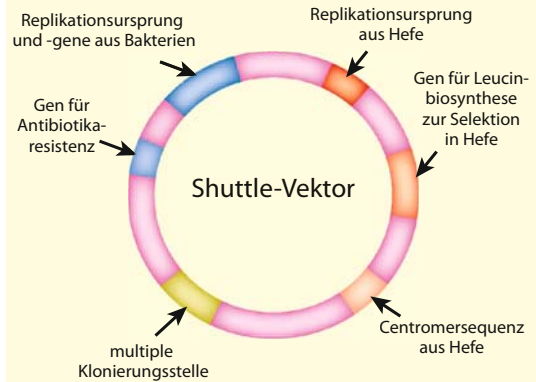
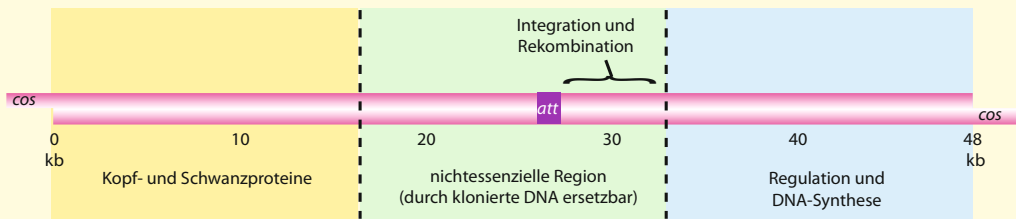
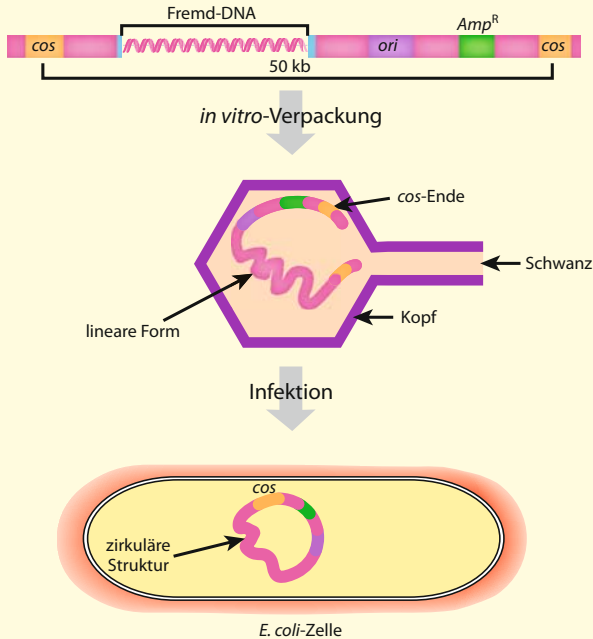
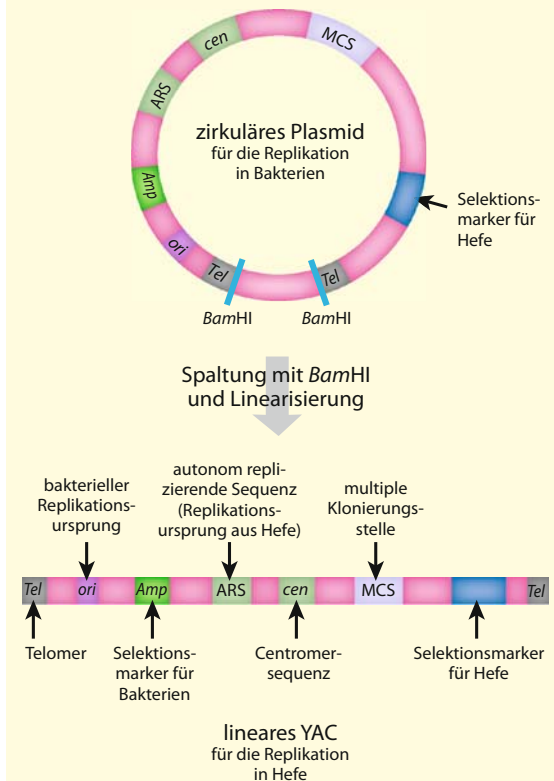
Spezielle Typen von Klonierungsvektoren

Da für die Manipulation von DNA *E. coli* der am häufigsten verwendete Wirtsorganismus ist, beruhen die meisten Vektoren auf Plasmiden oder Viren, die in *E. coli* oder ähnlichen Bakterien natürlich vorkommen. Die meisten Vektoren besitzen einen Replikationsursprung aus Bakterien und Gene für Antibiotikaresistenz. Der Polylinker (die multiple Klonierungsstelle) liegt in der Regel zwischen einem prokaryotischen

Promotor und Terminatorsequenzen. Einige Vektoren besitzen außerdem Ribosomenbindungsstellen, sodass jede eingefügte codierende Fremd-DNA-Sequenz in ein Protein translatiert werden kann. Viele andere Merkmale sind in spezialisierten Klonierungsvektoren vorhanden. Die folgende Betrachtung befasst sich mit den verschiedenen Vektorkategorien und ihren grundlegenden Eigenschaften (Abb. 3.15).

Viele Vektoren gehen auf das **2- μ m-Plasmid** der Hefe zurück. Das ursprüngliche 2- μ m-Plasmid wurde auf unterschiedliche Art und Weise verändert, um es als Klonierungsvektor nutzen zu können. Ein **Shuttle-Vektor** enthält Replikationsursprünge aus zwei Organismen und viele andere Sequenzen, die für seine Erhaltung in jedem dieser Organismen wichtig sind (s. Abb. 3.15b). Shuttle-Vektoren, die auf dem 2- μ m-Plasmid beruhen, tragen Komponenten, die für die Vermehrung und stabile Vererbung in Hefen und Bakterien notwendig sind, und zusätzlich eine Antibiotikaresistenz und einen Polylinker. So ist die Cen-Sequenz eine **Centromer-(Cen-)sequenz** aus Eukaryoten, die das Plasmid während der Mitose und der Meiose in Hefe korrekt positioniert. Weil Hefezellen eukaryotisch sind und eine dicke Zellwand besitzen, sind die meisten Antibiotika unwirksam. Daher ist eine andere Strategie notwendig, um die Anwesenheit eines Plasmids in der Hefezelle nachzuweisen. So befindet sich auf dem Plasmid beispielsweise ein Gen für die Synthese einer Aminosäure wie Leucin, wodurch Hefestämme, die Leucin (ohne Plasmid) nicht synthetisieren können, auf leucinfreiem Medium wachsen können.

Bakteriophagenvektoren sind Virusgenome, die so modifiziert wurden, dass sich große Stücke nicht-viraler DNA in dem Viruspartikel verpacken lassen. λ -Phagen haben lineare Genome mit zwei kohäsiven Enden – den **cos-Sequenzen** (**λ -kohäsive Enden**). Dabei handelt es sich um überhängende, kohäsive Enden mit einer Länge von 12 Basen. Im Viruskopf werden die Enden von Protein umhüllt, um zu verhindern, dass sie sich aneinander lagern. Nachdem sich der λ -Phage an *E. coli* geheftet hat, schleust er seine lineare DNA in das Bakterium ein. Die Proteine, die die Enden geschützt haben, werden abgebaut und das Genom schließt sich mithilfe der DNA-Ligase zu einem Ring. Die zirkuläre Form ist die **replikative Form (RF)** und wird über einen sogenannten **rolling circle**-Mechanismus repliziert (s. Kap. 4). Durch Expression einiger λ -Gene entstehen Proteine, die sich zur Proteinhülle zusammenlagern. In jedem dieser Phagenköpfe wird ein Genom verpackt bis ausreichend Phagenpartikel produziert wurden – die

a typischer bakterieller Vektor**b** Shuttle-Vektor aus Hefe**c** λ-Austauschvektor**d** Cosmid**e** künstliches Chromosom

E. coli-Zelle platzt und setzt neue Bakteriophagen frei, die andere Zellen infizieren.

Der λ -Phage ist ein häufig verwendeter Klonierungsvektor (s. Abb. 3.15c). Das mittlere Segment des λ -Genoms wurde entfernt und ein Polylinker eingesetzt. In diesen Polylinker lassen sich Fremd-DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 37 und 52 kb ligieren und in Viruspartikel verpacken. Um die Phagen-DNA einsetzen zu können, ohne die *E. coli*-Kultur zu zerstören, wurden mehrere für die Verpackung wichtige Gene entfernt. Sollen vollständige Bakteriophagen produziert werden, verwendet man **Helferviren**, die zwar keine Fremd-DNA aber die fehlenden Gene für Kopfproteine enthalten. Mit deren Hilfe können die Kopfproteine vollständig synthetisiert werden (Abb. 3.16). Diese Proteine setzen sich *in vitro* selbst zusammen. Lysate von Helferviren mit rekombinanter λ -DNA lassen sich also mischen, und es entstehen vollständige Viruspartikel. Dieses Verfahren ist als *in vitro*-Verpackung bekannt.

Cosmide können DNA-Fragmente mit einer Länge von bis zu 45 kb enthalten (s. Abb. 3.15d). Es handelt sich bei diesen Vektoren um stark veränderte λ -Vektoren, bei denen alle Sequenzen zwischen den *cos*-Stellen entfernt und durch Fremd-DNA ersetzt wurden. Die interessierende DNA wird mithilfe von Restriktionsenzymen und Ligase zwischen die beiden *cos*-Stellen ligiert. Diese Konstrukte werden in λ -Partikel verpackt, die von einem Helfervirus synthetisiert wurden (s. Abb. 3.16), und dann für die Infektion von *E. coli* eingesetzt.

Künstliche Chromosomen enthalten mit einer Länge von 150 bis 2000 kb die größten DNA-Stücke

(s. Abb. 3.15e). Zu ihnen gehören künstliche Hefechromosomen (engl. *yeast artificial chromosomes*, YACs), künstliche Bakterienchromosomen (engl. *bacterial artificial chromosomes*, BACs) und künstliche Chromosomen des Bakteriophagen P1 (engl. *P1 bacteriophage artificial chromosomes*, PACs). YACs können mit bis zu 2000 kb die größten DNA-Stücke enthalten. Sie besitzen Centromere und Telomere aus Hefe und werden daher in Hefe stabil vererbt. BACs können sich zu Ringen schließen und in Bakterien vermehrt werden, weshalb sie auch einen bakteriellen Replikationsursprung und Gene für die Antibiotikaresistenz enthalten. Aufgrund ihrer flexiblen Einsatzmöglichkeiten sind künstliche Chromosomen für die Sequenzierung ganzer Genome, insbesondere der Genome höherer Organismen mit einer riesigen Menge an DNA, am nützlichsten.

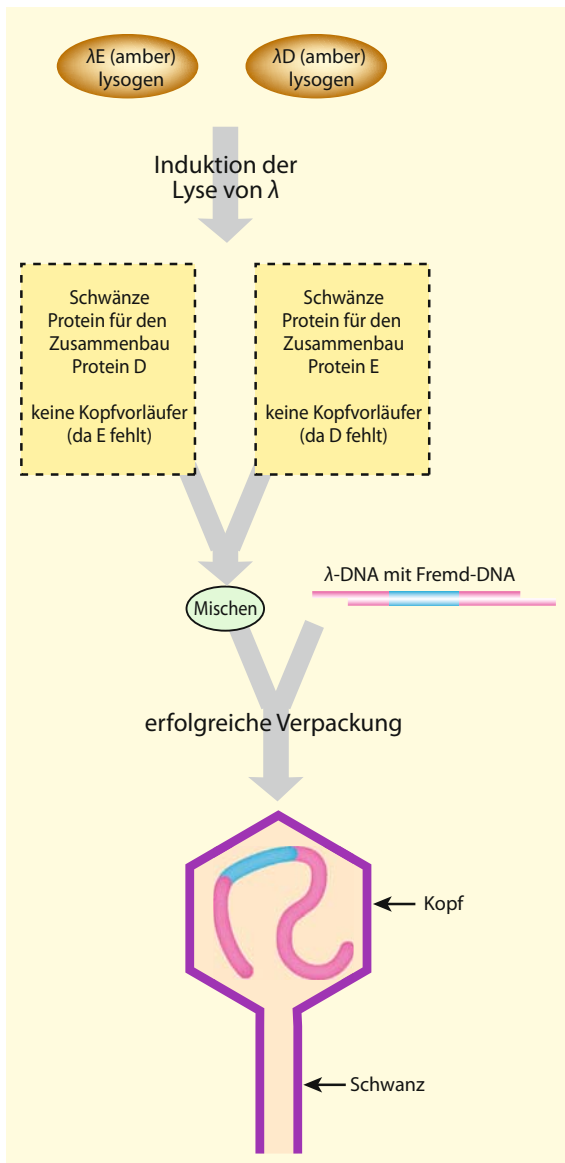
Der biotechnologischen Forschung stehen viele verschiedene Klonierungsvektoren zur Verfügung. Kleinere Gene lassen sich mithilfe von Plasmiden und Shuttle-Vektoren untersuchen, bei größeren werden dagegen Bakteriophagenvektoren, Cosmide und künstliche Chromosomen eingesetzt.

Shuttle-Vektoren tragen Sequenzen, die eine Vermehrung und stabile Vererbung in zwei unterschiedlichen Organismen wie Hefe und Bakterien ermöglichen.

Bei Bakteriophagenvektoren wurden wichtige Gene entfernt, sodass der Phage die Wirtszelle durch die Produktion von Phagenpartikeln nicht zerstören kann. Durch die Zugabe eines Helfervirus können aber wieder vollständige Viruspartikel entstehen.

3.15 Verschiedene Klonierungsvektoren

a Ein typischer Klonierungsvektor aus Bakterien. Dieser Vektor enthält bakterielle Sequenzen für die Initiation der Replikation und der Transkription. Außerdem trägt er eine multiple Klonierungsstelle, die im *lacZ α* -Gen liegt, sodass sich die Anwesenheit der Fremd-DNA mithilfe der α -Komplementation überprüfen lässt. Durch das Gen für Antibiotikaresistenz ist es möglich, *E. coli*-Zellen zu identifizieren, die das Plasmid enthalten. **b** Shuttle-Vektor aus Hefe. Dieser Vektor ist für Hefen und Bakterien konstruiert und trägt sowohl den bakteriellen Replikationsursprung als auch den aus Hefe, ein Hefecentromer wie auch Selektionsmarker für Hefe und Bakterien. Wie bei den meisten Klonierungsvektoren ist auch ein Polylinker vorhanden. **c** λ -Austauschvektor. Weil der λ -Phage leicht zu kultivieren und zu manipulieren ist, wurde sein Genom so modifiziert, dass es Fremd-DNA aufnehmen kann. Der grün dargestellte Bereich des Genoms ist für das Wachstum und die Verpackung der DNA nicht essenziell und kann durch große Fremd-DNA-Fragmente ersetzt werden (bis zu einer Größe von 23 kb). **d** Cosmide. Cosmide sind kleine Plasmide, die in großer Zahl vorkommen und sogenannte *cos*-Stellen enthalten. Sie werden linearisiert und geschnitten, sodass jede Hälfte eine *cos*-Stelle besitzt (nicht dargestellt). Als nächstes wird die Fremd-DNA eingebaut, und diese verbindet die beiden Hälften der Cosmid-DNA wieder. Dieses Konstrukt wird in den Köpfen von λ -Phagen verpackt, die dann *E. coli*-Zellen infizieren. **e** Künstliche Chromosomen. Künstliche Hefechromosomen (YACs) kommen in zwei Formen vor: einer zirkulären für die Vermehrung in Bakterien und einer linearen für die Vermehrung in Hefe. Das zirkuläre Chromosom bleibt in den Bakterien wie jedes andere Plasmid erhalten, das lineare Chromosom benötigt dagegen Telomersequenzen, um in Hefe stabil vererbt zu werden. Die lineare Form kann bis zu 2000 kb klonierter DNA enthalten und ist für die Genomforschung sehr nützlich.



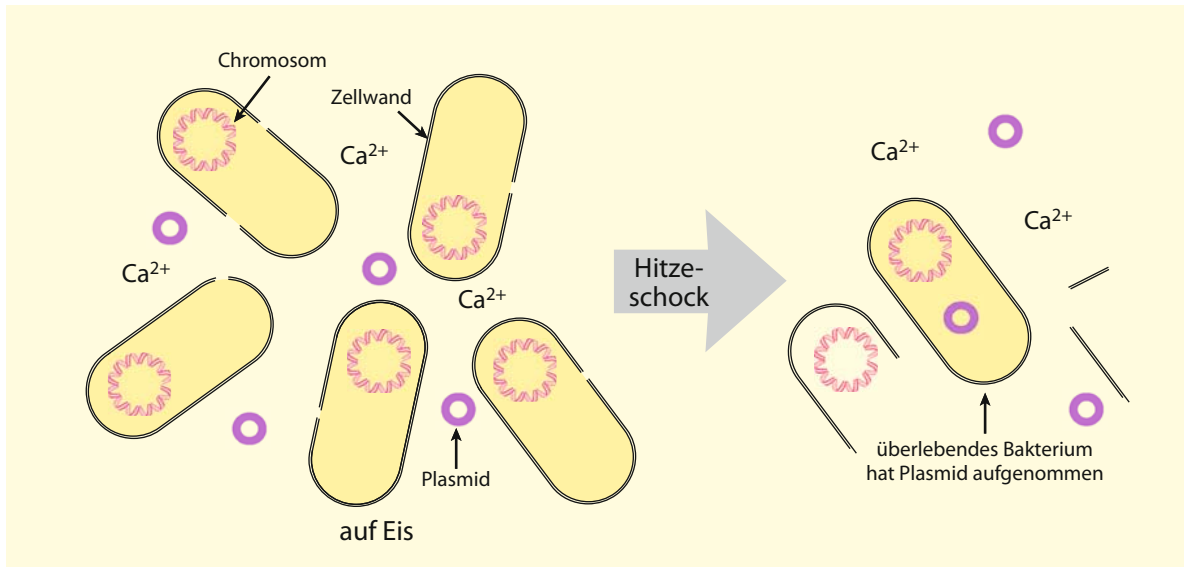
3.16 In vitro-Verpackung

Ein λ -Klonierungsvektor, der die klonierte DNA enthält, muss in einem Phagenkopf verpackt werden, bevor der Phage *E. coli* infizieren kann. Zunächst wird eine Kultur von *E. coli*-Zellen mit einem mutierten λ -Phagen infiziert, dem das Gen für eines der Kopfproteine (mit E bezeichnet) fehlt. Eine andere *E. coli*-Kultur wird mit einer anderen Mutante infiziert, der das Gen für ein weiteres Kopfprotein (mit D bezeichnet) fehlt. In beiden Kulturen wird die Lyse induziert. Dadurch werden die Schwänze, die Proteine für den Zusammenbau und die Kopfproteine freigesetzt – jedoch nicht die vollständigen Köpfe, weil Proteine fehlen. Werden diese Ansätze mit einem λ -Austauschvektor gemischt, dann bilden sich spontan vollständige Viruspartikel, die DNA enthalten und anschließend für eine Infektion von *E. coli* verwendet werden können.

Einschleusen klonierter Gene in Bakterien durch Transformation

Wurde das interessierende Gen in einen Vektor kloniert, kann das Konstrukt wieder in eine Bakterienzelle eingebracht werden, diesen Vorgang bezeichnet man als **Transformation** (Abb. 3.17). Hierbei wird „nackte“, im Labor konstruierte DNA mit **kompetenten** *E. coli*-Zellen gemischt. Um die Zellen kompetent, also bereit für die Aufnahme nackter DNA zu machen, muss die Zellwand vorübergehend porös gemacht werden. Im Labor werden *E. coli*-Zellen auf Eis mit hohen Konzentrationen an Calciumionen behandelt und anschließend für wenige Minuten bei einer erhöhten Temperatur inkubiert. Die meisten Zellen sterben während der Behandlung ab, doch einige überleben und nehmen die DNA auf. Ein anderes Verfahren für die Gewinnung kompetenter Zellen ist das Anlegen einer elektrischen Spannung. Eine solche **Elektroporation** öffnet die Zellwand kurzzeitig, sodass die DNA in die Zellen gelangen kann. Das Verfahren ist schneller und vielseitiger einsetzbar und wird auch bei anderen Bakterien als *E. coli* und bei Hefen angewendet.

Werden Bakterien mit einem Gemisch aus unterschiedlichen rekombinanten Plasmiden transformiert, wie bei der Erstellung einer Genbibliothek (s. unten), dann verlieren die Zellen, die mehr als ein Konstrukt aufnehmen, in der Regel eines der Konstrukte. Werden z.B. die Gene A und B beide in die gleiche Art von Vektor kloniert und dann in dieselbe Bakterienzelle eingeschleust, so wird das Bakterium ein Plasmid verlieren und das andere behalten. Dies ist eine Folge der **Plasmidinkompatibilität**, die verhindert, dass eine Bakterienzelle zwei Plasmide desselben Typs enthält. Die Inkompatibilität geht auf identische oder ähnliche Replikationsursprünge zurück. In einer Zelle ist nur einem Replikationsursprung die Replikation erlaubt. Soll eine Zelle mit zwei klonierten Genen ausgestattet werden, dann müssen zwei verschiedene Plasmidtypen verwendet oder beide Gene in dasselbe Plasmid kloniert werden.



3.17 Transformation

Bakterienzellen können rekombinante Plasmide durch eine Inkubation mit Calcium auf Eis und einen anschließenden kurzen Hitzeschock aufnehmen.

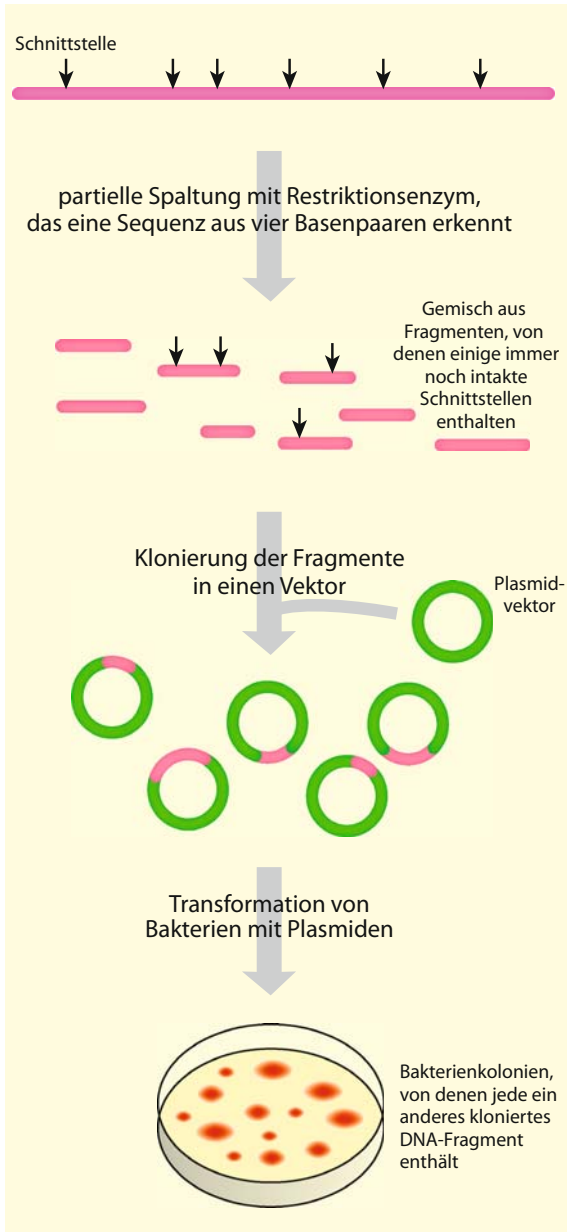
Herstellung einer Genbibliothek

Genbibliotheken werden eingesetzt, um neue Gene zu finden, Genome zu sequenzieren oder Gene unterschiedlicher Organismen zu vergleichen (Abb. 3.18). Bei der Herstellung einer Genbibliothek wird die gesamte DNA eines bestimmten Organismus mit Restriktionsenzymen geschnitten, die Fragmente werden anschließend in Vektoren kloniert und ein passender Wirtsorganismus mit diesen rekombinanten Vektoren transformiert.

Die grundlegenden Schritte der Herstellung einer Bibliothek sind:

1. Isolierung der chromosomalen DNA aus einem Organismus wie *E. coli*, Hefe oder Mensch.
2. Restriktionsspaltung der DNA mit einem oder zwei Restriktionsenzymen.
3. Linearisierung eines geeigneten Klonierungsvektors mit dem gleichen Restriktionsenzym(en).
4. Mischen der geschnittenen chromosomalen Fragmente mit dem linearisierten Vektor und Ligation.
5. Transformation von *E. coli* mit diesem Gemisch.
6. Isolierung einer großen Zahl von *E. coli*-Transformanten.

Die Art des Restriktionsenzym beeinflusst die Art der Bibliothek. Da Restriktionsschnittstellen nicht gleichmäßig über das Genom verteilt sind, werden einige der entstehenden DNA-Fragmente groß sein und andere klein. Die Verwendung eines Restriktionsenzym, das eine Sequenz aus nur vier Basenpaaren erkennt, ergibt ein Gemisch aus meist kleinen Fragmenten. Die Verwendung eines Enzyms, das eine Erkennungssequenz mit einer Länge von sechs oder acht Basenpaaren hat, wird größere Fragmente produzieren. (Die Wahrscheinlichkeit eine Sequenz aus vier Basen in einem Genom zu finden ist größer als die, eine Sequenz aus sechs Basen zu finden.) Auch wenn ein Restriktionsenzym mit einer Sequenz aus vier Basenpaaren eingesetzt wird, können sich immer noch Fragmente ergeben, die für eine Klonierung zu groß sind. Umgekehrt werden einige Gene mit dicht nebeneinander liegenden Restriktionsschnittstellen in viele Fragmente gespalten. Um dieses zu vermeiden, wird häufig eine partielle Spaltung durchgeführt. Die Einwirkzeit des Enzyms auf die DNA wird verkürzt, sodass die DNA nicht an jeder möglichen Schnittstelle gespalten wird und größere Fragmente erhalten bleiben. Außerdem ist es üblich, eine weitere Bibliothek herzustellen, bei der man ein anderes Restriktionsenzym verwendet.



3.18 Herstellung einer DNA-Bibliothek

Zunächst wird genomische DNA aus dem ausgewählten Organismus partiell mit einem Restriktionsenzym geschnitten, das eine Sequenz aus vier Basenpaaren erkennt. Es handelt sich hier um eine partielle Spaltung, weil einige der möglichen Schnittstellen nicht geschnitten werden sollen, sodass größere Fragmente entstehen. Würde die DNA an jeder möglichen Schnittstelle auch tatsächlich gespalten, dann enthielte die gewonnene genomische DNA nur wenige vollständige Gene. Die genomischen Fragmente werden in einen geeigneten Vektor kloniert und Bakterien anschließend mit diesen rekombinanten Plasmiden transformiert.

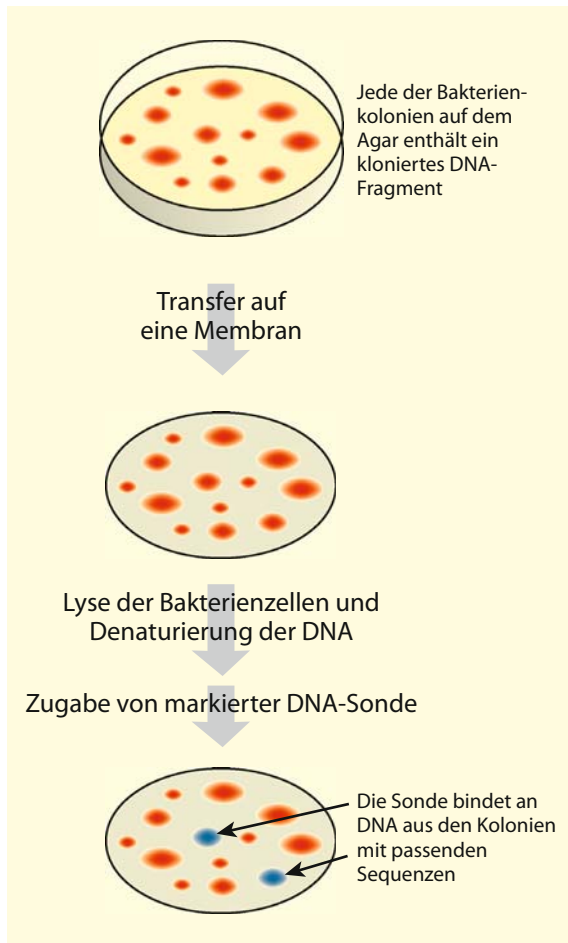
Genbibliotheken werden für viele Zwecke eingesetzt, weil sie nahezu alle Gene eines bestimmten Organismus enthalten.

Screening der Genbibliothek durch Hybridisierung

Ist eine Bibliothek hergestellt, dann soll häufig ein bestimmtes Gen oder DNA-Segment in der Bibliothek identifiziert werden. Manchmal ist das interessierende Gen einem Gen aus einem anderen Organismus ähnlich, oder es enthält eine bestimmte Sequenz. So nutzen z.B. viele Enzyme ATP als Energielieferanten. ATP-bindende Enzyme haben eine Signatursequenz, die ihnen gemeinsam ist, ob sie nun aus Bakterien stammen oder vom Menschen. Diese Sequenz lässt sich bei der Suche nach anderen ATP-bindenden Enzymen nutzen. Solche gemeinsamen Sequenzmotive weisen möglicherweise darauf hin, dass ein Protein verschiedene Cofaktoren, andere Proteine und DNA bindet, um nur einige Beispiele zu nennen.

Das Screening von DNA-Bibliotheken durch Hybridisierung erfordert die Herstellung der DNA-Bibliothek und einer markierten Sonde. Eine Genbibliothek wird als Bakterienkultur in *E. coli*-Zellen gespeichert, wobei jede Zelle ein Plasmid mit einer anderen Fremd-DNA trägt. Die Kultur wird angezogen, verdünnt und anschließend auf vielen Agarplatten ausgestrichen, sodass sich die sich nun entwickelnden Kolonien nicht berühren. Die Kolonien werden auf eine Nylonmembran übertragen und die DNA jeder Kolonie durch Lyse der Zellen mit einem Detergens freigesetzt. Die Zellbestandteile werden von der Membran gespült, die DNA jedoch auf der Nylonmembran fixiert und denaturiert, sodass Einzelstränge entstehen (Abb. 3.19).

Soll ein bestimmtes Gen im Zielorganismus identifiziert werden, dann könnte man als Sonde das korrespondierende Gen aus einem verwandten Organismus verwenden. Bei der Sonde handelt es sich in der Regel nur um einen Teil des Gens, da sich kleinere Fragmente leichter handhaben lassen. Die Sonden-DNA kann entweder radioaktiv oder für einen Nachweis mithilfe von Chemilumineszenz markiert werden. Sie wird erhitzt, um Einzelstränge zu erhalten, und anschließend mit der auf den Nylonfiltern fixierten DNA-Bibliothek inkubiert. Befinden sich in der Bib-



3.19 Screening einer Bibliothek mit einer DNA-Sonde

Zunächst werden Bakterienzellen, die die Fremd-DNA der Bibliothek enthalten, angezogen und auf großen Agarplatten ausgestrichen, sodass viele Kolonien entstehen und mit einer hohen Wahrscheinlichkeit jedes klonierte DNA-Fragment vertreten ist. Diese Kolonien werden auf Nylonmembranen übertragen und die Zellen lysiert. Die Zellreste werden abgewaschen, die genomische DNA bleibt jedoch an der Membran hängen. Die Sequenzen werden durch Inkubation der Membranen in einer starken Base denaturiert. Werden diese einzelsträngigen DNA-Fragmente mit einer radioaktiv markierten, einzelsträngigen Sonde bei einer geeigneten Temperatur inkubiert, hybridisiert die Sonde mit allen passenden Sequenzen auf den Membranen.

liothek passende Sequenzen, so werden diese mit der Sonde hybridisiert. Ob auch bei nicht perfekt passenden DNA-Sequenzen eine Hybridisierung stattfindet, lässt sich durch die Inkubationstemperatur regulieren. Je höher die Temperatur, umso stringenter sind die

Bedingungen, d.h. umso besser müssen die Sequenzen passen, damit sie hybridisieren. Je geringer die Temperatur, umso weniger stringent sind die Bedingungen. Wurde die Sonde radioaktiv markiert, wird ein Röntgenfilm an den Stellen geschwärzt, an denen die Sonde mit der DNA-Bibliothek hybridisiert hat. Durch einen Abgleich zwischen Film und Agarplatte lässt sich die Kolonie mit der entsprechenden Fremd-DNA identifizieren. Dabei ist es üblich, die wahrscheinlichste Kolonie und auch deren benachbarte Kolonien auszuwählen, zu kultivieren, auszuplattieren und nochmals mit derselben Sonde zu testen. So soll sichergestellt werden, dass ein einzelner Transformant isoliert wurde. Die DNA aus diesem Isolat lässt sich durch Sequenzierung analysieren (s. Kap. 4).

Das Screening einer DNA-Bibliothek besteht aus zwei Teilen. Zunächst werden die auf Agarplatten kultivierten Bakterienklone auf Nylonmembranen übertragen, die Zellkomponenten entfernt und die auf der Membran fixierte DNA denaturiert. Anschließend wird eine Sonde radioaktiv markiert, durch Hitze denaturiert und dann mit der Nylonmembran inkubiert, wobei die Sonde mit passenden Sequenzen hybridisiert.

Expressionsbibliotheken in Eukaryoten

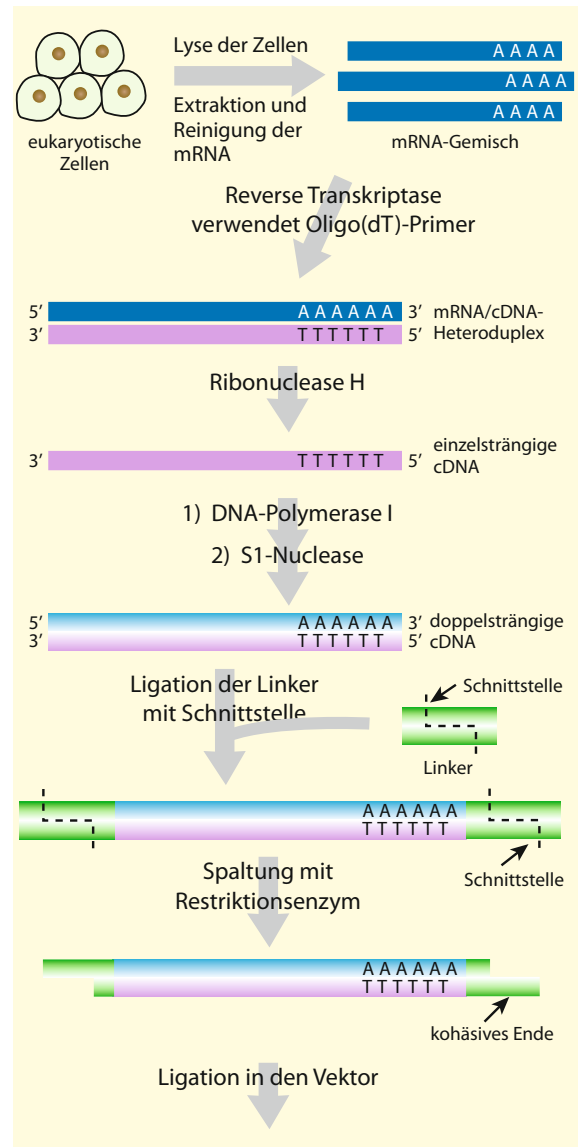
Vektoren von **Expressionsbibliotheken** besitzen die für die Transkription und Translation der Fremd-DNA erforderlichen Sequenzen. Das bedeutet, dass die Fremd-DNA in RNA transkribiert und diese wiederum in ein Protein translatiert werden kann. Eine Expressionsbibliothek stellt von jeder klonierten Fremd-DNA ein Protein her, ob es sich um ein reales Gen handelt oder nicht. Bei der Untersuchung eukaryotischer DNA werden solche Bibliotheken auf der Grundlage von **komplementärer DNA (cDNA)** hergestellt, um sicherzustellen, dass es sich bei der Fremd-DNA tatsächlich um ein Gen handelt. Die eukaryotische DNA, insbesondere die aus Höheren Pflanzen und Tieren, enthält zum Großteil nichtcodierende Sequenzen; die codierenden Bereiche liegen weit voneinander entfernt und die Gene sind sogar durch nichtcodierende Introns unterbrochen. cDNA ist eine doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA, die durch die Reverse Transkriptase gebildet wird. Das Enzym wurde zuerst in

Retroviren entdeckt (s. Kap. 1). Es wird in der Forschung bei Eukaryoten eingesetzt, um eine Version eines Gens zu erzeugen, die keine Introns, sondern ausschließlich die codierende Sequenz enthält. Im Gegensatz zu Eukaryoten enthalten Bakterien nur sehr wenig nichtcodierende DNA und ihre Gene sind nicht von Introns unterbrochen; die bakterielle genomische DNA kann daher direkt für die Herstellung einer Expressionsbibliothek eingesetzt werden.

Um eine Expressionsbibliothek herzustellen, wird eukaryotische DNA in cDNA umgeschrieben (Abb. 3.20). Dafür wird zunächst mRNA aus einem interessierenden Organismus durch Bindung an eine Säulenmatrix mit Oligo(dT) (d.h. mit einer Reihe von Thyminresten) isoliert. Durch dieses Verfahren lässt sich eukaryotische mRNA anreichern, da diese einen Poly(A)-Schwanz besitzt, der an das Oligo(dT) der Matrix bindet. Mithilfe der Reversen Transkriptase wird nun eine zur mRNA komplementäre cDNA-Sequenz synthetisiert. Das doppelsträngige Hybridmolekül aus mRNA und cDNA wird durch RNase H und DNA-Polymerase I in eine doppelsträngige cDNA überführt; dabei schneidet RNase H das mRNA-Rückgrat und die DNA-Polymerase I ersetzt den mRNA-Strang durch DNA (s. Abb. 3.20).

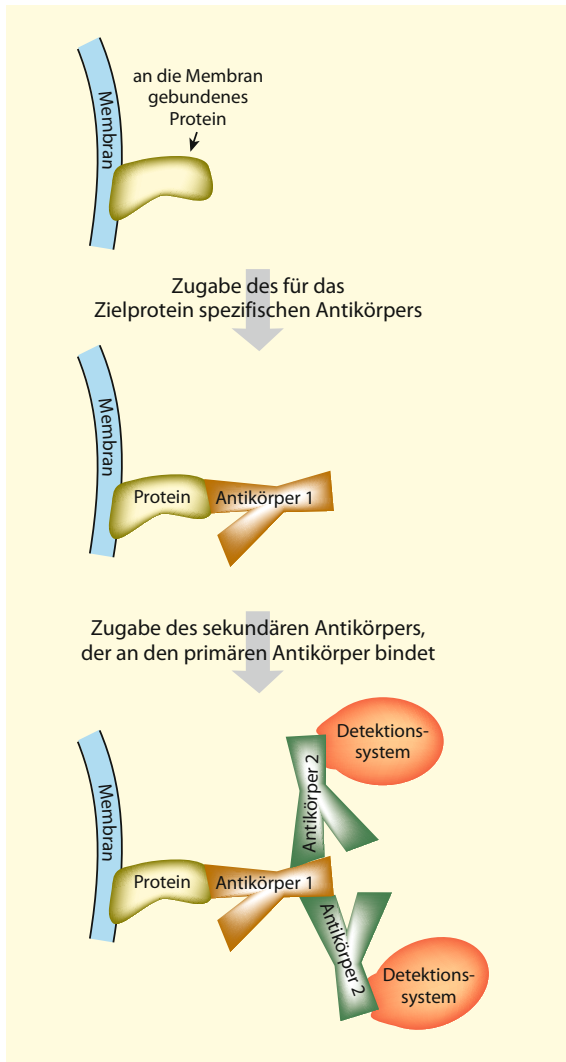
Die cDNA wird anschließend in einen **Expressionsvektor** ligiert, der Sequenzen enthält, die Transkription und Translation der Fremd-DNA initiieren. In manchen Fällen besitzt die Fremd-DNA (z.B. eine sogenannte *fulllength*-cDNA) einen eigenen Translationsstart. Fehlt der Fremd-DNA allerdings eine solche Sequenz, was häufig der Fall ist, dann ist das Leseraster von Bedeutung. Da der genetische Code in Triplets abgelesen wird, kann jede Fremd-DNA in drei verschiedenen Leserastern in ein Protein translatiert werden, doch nur ein Raster wird das korrekte Protein liefern. Um Fremd-DNA in dem korrekten Leseraster zu erhalten, wird jede cDNA in allen drei Rastern kloniert, indem man Linker verwendet, die viele verschiedene Restriktionsschnittstellen enthalten. Die Zahl der Transformanten, die gesichtet werden müssen, steigt dadurch stark an.

Nun transformiert man Bakterien mit den klonierten Genen, um die Fremd-DNA zu exprimieren. Die Bakterien werden auf Agar kultiviert, die Kolonien auf eine Nylonmembran übertragen und lysiert. Die dadurch freigesetzten Proteine bleiben an der Membran haften und lassen sich durch unterschiedliche Verfahren untersuchen. Am häufigsten wird ein Antikörper gegen das interessierende Protein verwendet (s. Kap. 6). Er bindet an das Protein und lässt sich über einen zweiten Antikörper, der mit einem Detekti-



3.20 Herstellung einer cDNA-Bibliothek aus eukaryotischer mRNA

Zunächst werden die eukaryotischen Zellen lysiert und die mRNA gereinigt. Dann gibt man Reverse Transkriptase und Oligo(dT)-Primer zu. Die Oligo(dT)-Sequenz hybridisiert mit den Adeninresten des Poly(A)-Schwanzes der mRNA und dient als Primer für das Enzym. Die Reverse Transkriptase synthetisiert einen cDNA-Strang und es entsteht ein mRNA-cDNA-Hybrid. Der mRNA-Strang wird mit Ribonuclease H abgebaut, anschließend wird DNA-Polymerase I zugegeben, um den zweiten DNA-Strang zu synthetisieren, wodurch eine doppelsträngige cDNA entsteht. Nun entfernt S1-Nuclease die einzelsträngigen Enden und Linker werden an die Enden der dsDNA angefügt. Diese Linker enthalten Schnittstellen für Restriktionsenzyme, um die cDNA leicht in einen Vektor klonieren zu können.



3.21 Immunologisches Screening einer Expressionsbibliothek

Bakterien, die Fremd-Gene exprimieren, werden auf Agarplatten ausgestrichen, kultiviert, auf eine Membran übertragen und lysiert. Freigesetzte Proteine werden an die Membran gebunden. Diese Abbildung zeigt nur ein an der Membran fixiertes Protein, doch in Wirklichkeit sind es viele verschiedene Proteine. Zu ihnen gehören sowohl die exprimierten Klone der Bibliothek als auch die bakteriellen Proteine. Die Membran wird mit einem primären Antikörper inkubiert, der nur an das interessierende Protein bindet. Um diesen Komplex aus Protein und Antikörper nachzuweisen, wird ein sekundärer Antikörper zugegeben, der mit einem Detektionssystem wie der Alkalischen Phosphatase konjugiert ist und an den ersten Antikörper bindet. Die Bakterienkolonie, die das interessierende Protein exprimiert, färbt sich nach Zugabe des Substrates X-Phos blau. Dadurch lässt sich der Vektor mit der gewünschten Fremd-DNA isolieren.

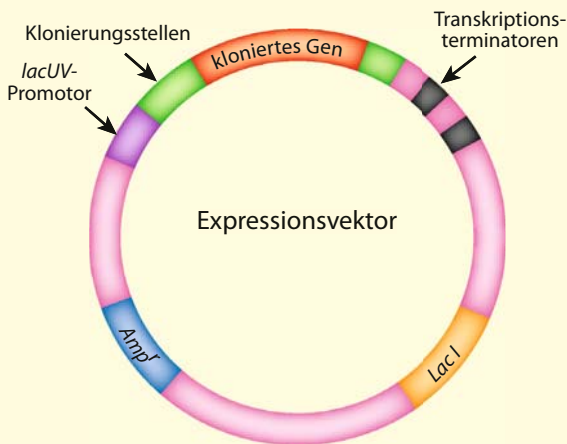
onssystem (häufig die Alkalische Phosphatase) konjugiert ist, nachweisen. Der gesamte Komplex lässt sich sichtbar machen, weil die Alkalische Phosphatase X-Phos spaltet. Dadurch entsteht an der Stelle ein blauer Farbstoff, an der sich eine Kolonie befindet, die das gesuchte Protein exprimiert (Abb. 3.21). *E. coli* vermag die meisten posttranslationalen Modifikationen, denen eukaryotische Proteine häufig unterliegen, nicht auszuführen. Daher liegen die Proteine zwar nicht immer in ihrer nativen Form vor, können jedoch häufig trotzdem durch den entsprechenden spezifischen Antikörper detektiert werden.

cDNA wird hergestellt, indem man mRNA isoliert und mithilfe der Reversen Transkriptase eine cDNA-Kopie herstellt.

Expressionsbibliotheken exprimieren eine klonierte Fremd-DNA in ein Protein, weil die verwendeten Vektoren Sequenzen enthalten, die für die Transkription und Translation erforderlich sind. Das interessierende Protein wird durch Inkubation der Bibliothek mit einem Antikörper gegen dieses Protein nachgewiesen.

Eigenschaften von Expressionsvektoren

Weil fremde Proteine, besonders, wenn sie in großen Mengen hergestellt werden, für *E. coli* toxisch sein können, ist der Promotor, der die Expression der Fremd-Gene steuert, entscheidend. Wird zu viel Protein synthetisiert, kann die Wirtszelle absterben. Um die Proteinsynthese zu regulieren, besitzen Expressionsvektoren Promotoren mit an/aus-Schaltern. Die Wirtszellen vermehren sich zunächst und das Fremd-Protein wird erst zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert. Ein häufig verwendeter Promotor ist eine mutierte Version des *lac*-Promotors (Abb. 3.22). Die von diesem *lacUV*-Promotor ausgehende Transkription ist sehr stark, doch erst, nachdem der Promotor induziert wurde. Er umfasst die folgenden Elemente: eine Bindungsstelle für die RNA-Polymerase, eine Bindungsstelle für das LacI-Repressorprotein und einen Transkriptionsstart. Der Vektor besitzt außerdem starke Transkriptionsstopps stromabwärts des Polylinkers. Zudem enthält der Vektor ein LacI-codierendes Gen, sodass viel Repressorprotein synthetisiert wird, welches die klonierten Gene reprimiert.



3.22 Expressionsvektoren haben streng regulierte Promotoren

Ein Expressionsvektor enthält stromaufwärts des klonierten Gens Sequenzen, die die Transkription und die Translation des klonierten Gens regulieren. Der abgebildete Vektor enthält den starken, induzierbaren *lacUV*-Promotor. Um die Transkription zu stimulieren, wird der künstliche Induktor IPTG zugegeben. IPTG bindet an den LacI-Repressor, der sich anschließend von der DNA löst. Dadurch vermag die RNA-Polymerase das Gen zu transkribieren. Vor der Zugabe von IPTG verhindert der LacI-Repressor die Expression des klonierten Gens.

Wie alle Vektoren besitzt auch dieser einen Replikationsursprung und ein Gen für Antibiotikaresistenz, zur Selektion der Bakterien. Wird eine Genbibliothek hinter den Promotor kloniert, dann werden die Gene aufgrund der großen Menge an LacI-Repressor nicht exprimiert. Gibt man einen Induktor wie IPTG zu, dann löst sich LacI von der DNA und die RNA-Polymerase transkribiert die klonierten Fremdgene.

Ein weiterer häufig in Expressionsvektoren verwendeter Promotor ist der λ -*left*-Promotor P_L . Er besitzt eine Bindungsstelle für den λ -Repressor. Das interessierende Gen bzw. Bibliotheksfragment wird so lange nicht exprimiert, bis der Repressor entfernt ist. Statt den natürlichen Induktor zu verwenden, kommt eine mutierte Version des Repressors zum Einsatz, die die Bindungsstelle bei hohen Temperaturen freigibt. Steigt die Temperatur der Kultur auf 42 °C an, fällt der Repressor von der DNA ab und die RNA-Polymerase transkribiert die klonierten Gene.

Ein anderes Expressionssystem verwendet einen Promotor, an dessen Bindungsstelle für die RNA-

Polymerase nur die RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 bindet. Das bakterielle Enzym wird das interessierende Gen nicht transkribieren. Dieses System wurde ausschließlich für Bakterien entwickelt, in deren Chromosom das Gen für die T7-RNA-Polymerase, welches unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht, integriert wurde.

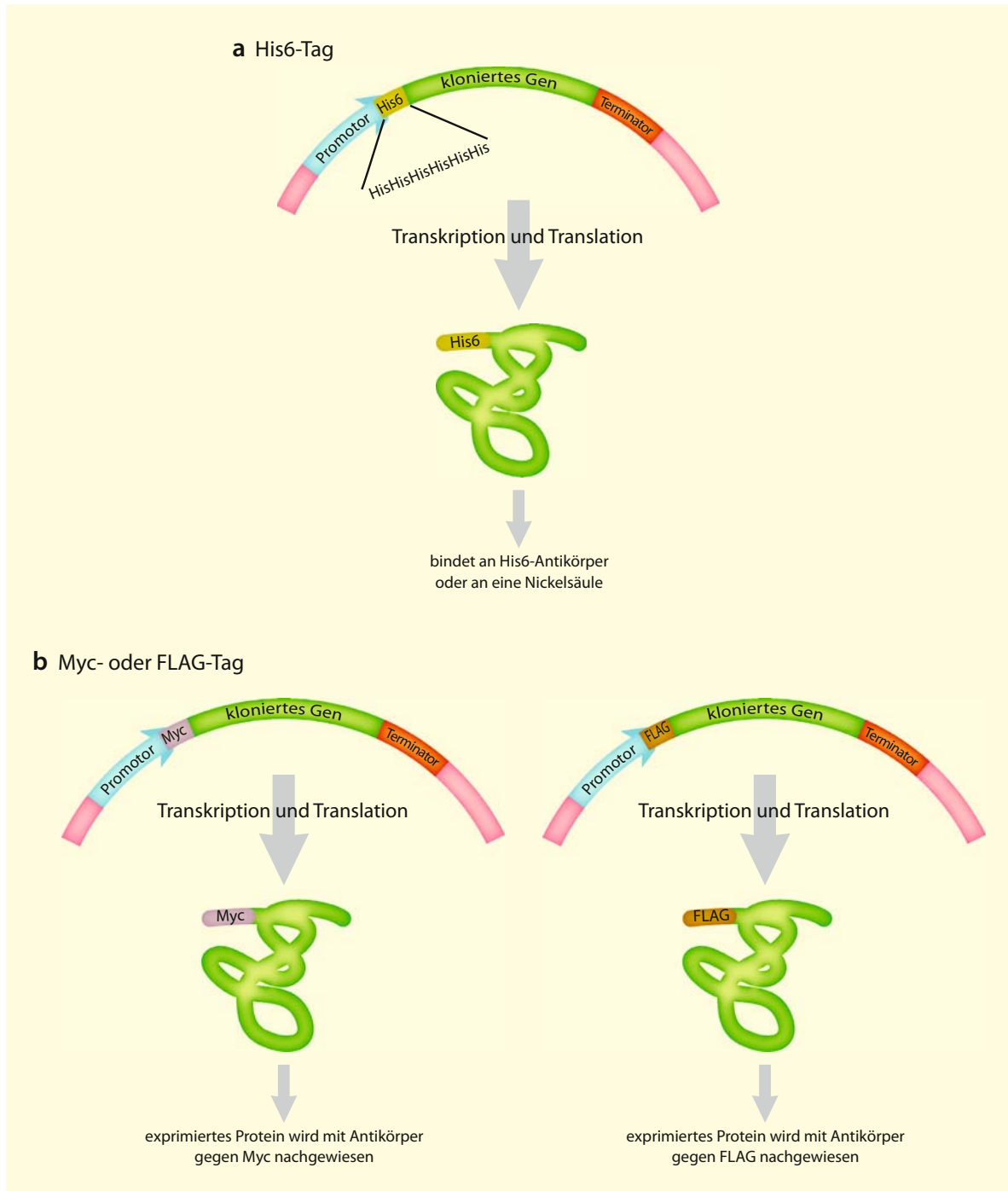
Einige Expressionsvektoren enthalten ein kleines DNA-Segment, das ein Protein-Tag codiert. Diese Vektoren werden hauptsächlich dann eingesetzt, wenn das interessierende Gen bereits kloniert wurde, und nicht für das Screening von Bibliotheken. Das interessierende Gen muss im Leseraster mit der DNA des Protein-Tags kloniert werden. Das Tag kann vielfältig sein, doch sind **His6-**, **Myc-**, und **FLAG-Tag** die drei bekanntesten (Abb. 3.23). His6 ist eine Reihe von sechs Histidinresten, die an den Anfang oder das Ende des interessierenden Proteins gehängt wird. Die Histidine binden fest an Nickel, wodurch sich das His-markierte Protein über die Bindung an eine Nickelsäule isolieren lässt. Myc und FLAG sind Epitope für spezifische Antikörper, durch deren Bindung sich die exprimierten Proteine anreichern lassen. Die Antikörper können an eine Säulenmatrix gebunden sein, für einen Western-Blot eingesetzt oder *in vivo* nachgewiesen werden, wenn man die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Versionen des Myc- bzw. FLAG-Antikörpers inkubiert. (Auch für das Histidin-Tag existieren spezifische Antikörper.)

Das wichtigste Merkmal von Expressionsvektoren ist ein streng kontrollierter Promotor. Die Proteine der Expressionsbibliothek werden nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert, wie etwa bei Anwesenheit eines Induktors, der Entfernung eines Repressors oder Temperaturveränderung.

Kleine Tags lassen sich mithilfe eines Expressionsvektors mit dem interessierenden Gen fusionieren. Durch diese Tags ist es möglich, das interessierende Protein zu isolieren und zu reinigen.

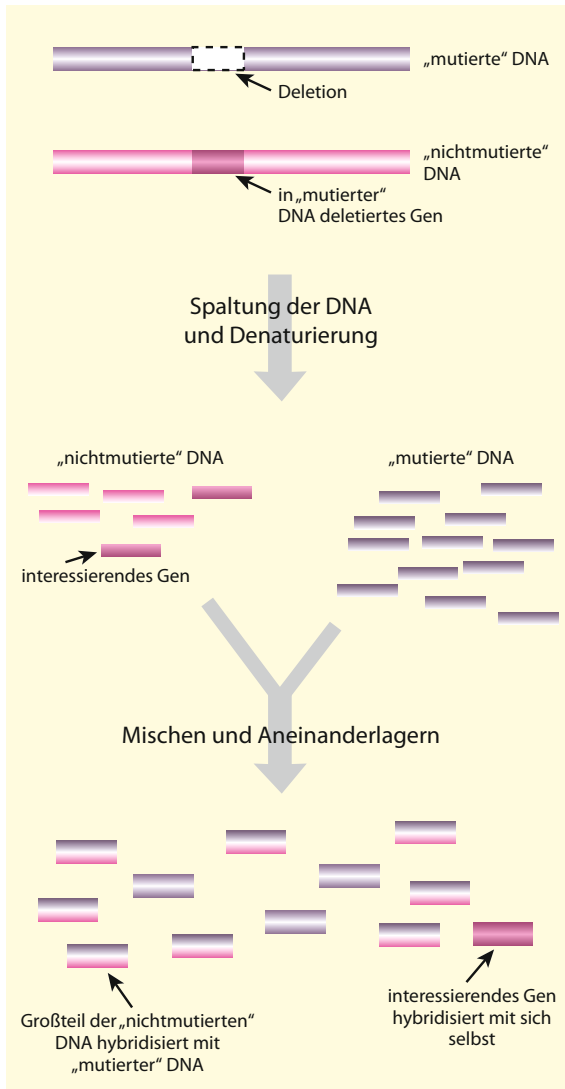
Subtraktive Hybridisierung

Die subtraktive Hybridisierung ist ein Screening-Verfahren, durch das Wissenschaftler fehlende Gene identifizieren können. So kann bei einem Patienten z.B. ein Gen fehlen, eine Situation, die eine vererbte Krankheit hervorruft. Ein gesunder Mensch besitzt dagegen das vollständige Gen. Die DNA der beiden



3.23 Verwendung von Tags für die Isolierung von Proteinen

Einige Expressionsvektoren besitzen DNA-Sequenzen, die kurze Protein-Tags codieren. Das His6-Tag (**a**) codiert sechs Histidinreste. Wird die codierende Sequenz des klonierten Gens im Leseraster (*in frame*) mit diesem Tag kloniert, dann wird das Tag mit dem Protein fusioniert. Das His6-Tag bindet spezifisch an Nickelionen. Proteine mit einem solchen Tag lassen sich daher über Nickelionensäulen isolieren. Andere Tags wie Myc oder FLAG (**b**) sind Epitope für spezifische Antikörper und wirken ähnlich. Proteine mit Myc- oder FLAG-Tag lassen sich durch die Bindung an Antikörper gegen Myc bzw. FLAG isolieren oder nachweisen.

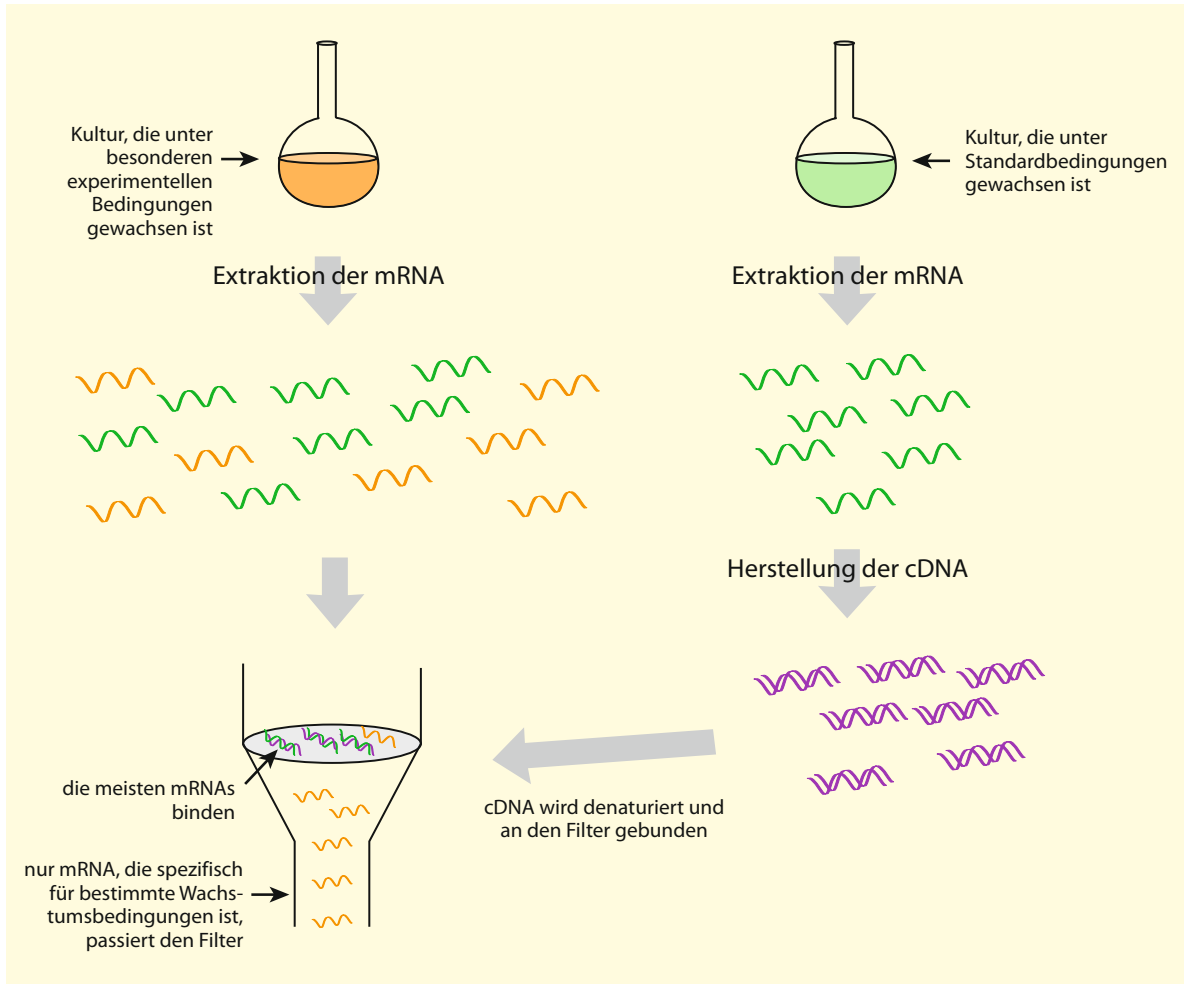


3.24 Klonierung durch subtraktive Hybridisierung

Der Schlüssel zur subtraktiven Hybridisierung ist die Hybridisierung der gesamten Wildtyp- bzw. gesunden DNA-Fragmente (rosa) mit einem Überschuss an mutierter DNA (violett). In diesem Beispiel wird die mutierte DNA mit Restriktionsenzym 1 geschnitten, die Wildtyp-DNA mit Restriktionsenzym 2. Anschließend werden die beiden DNA-Proben gemischt, denaturiert und wieder renaturiert. Dabei entstehen Hybride aus zwei mutierten Strängen (flankiert von Schnittstellen des Restriktionsenzyms 1), aus einem mutierten und einem nichtmutierten Strang (mit inkompatiblen Enden) oder aus zwei nichtmutierten Strängen (mit Schnittstellen des Restriktionsenzyms 2 an den Enden). Hybride aus zwei nichtmutierten Strängen sind selten, sie entsprechen der deletierten Region. Sie lassen sich durch Klonierung in einen Vektor, der mit dem Restriktionsenzym 2 geschnitten wurde, leicht von den anderen Hybriden trennen.

Personen ist bis auf das zusätzliche Gensegment in dem gesunden Individuum identisch. Die DNA der Person mit der Deletion wird isoliert und mit einem Restriktionsenzym geschnitten (Abb. 3.24). Auch die DNA des Gesunden wird isoliert, jedoch mit einem anderen Enzym geschnitten. Die mutierte DNA wird im Überschuss zu der DNA aus dem gesunden Menschen gegeben und das Gemisch durch Erhitzen denaturiert. Beim langsamen Abkühlen entstehen Hybridmoleküle aus der normalen und der mutierten DNA. Lagern sich zwei mutierte Allele aneinander, dann wird das dsDNA-Fragment die Schnittstellen des Restriktionsenzyms 1 an den Enden besitzen. Lagern sich zwei nichtmutierte Fragmente aneinander, dann wird das Hybrid an den Enden die Schnittstellen von Restriktionsenzym 2 tragen. Hybridisieren ein mutierter und ein nichtmutierter Strang, dann besitzen die Enden weder die Schnittstellen von Enzym 1 noch von Enzym 2, sie sind nichtkompatibel. Auch alle anderen Bereiche der DNA können Hybride zwischen mutierten und nichtmutierten Fragmenten bilden, außer dem Bereich, der in der mutierten DNA fehlt. Diese DNA-Region kann nur mit sich selbst hybridisieren und die entstehende dsDNA besitzt an den Enden die Schnittstellen von Restriktionsenzym 2. Diese Segmente lassen sich in einen Vektor mit den korrespondierenden Schnittstellen klonieren. Die DNA, die das interessierende Gen nicht codiert, wird von der Hybridisierung ausgeschlossen.

Die subtraktive Hybridisierung wird auch eingesetzt, um die Genexpression unter zwei verschiedenen Bedingungen miteinander zu vergleichen (Abb. 3.25). Ein Forscher kann beispielsweise feststellen, welche *E. coli*-Gene bei niedrigen Temperaturen und welche unter Hitzeschockbedingungen exprimiert werden. Zunächst werden Bakterienkulturen unter beiden Bedingungen angezogen und jeweils die mRNA isoliert. Die mRNA aus den Bakterien, die bei niedrigen Temperaturen kultiviert wurden, wird in cDNA transkribiert, um die komplementären Sequenzen für die Hybridisierung zu erhalten. Die cDNA wird denaturiert, um ssDNA zu erhalten, an eine Membran gebunden und anschließend mit der mRNA aus den Bakterien inkubiert. Diese wurde unter besonderen experimentellen Bedingungen (wie Hitzeschock) kultiviert. Die mRNA, die unter beiden Bedingungen in den Zellen vorhanden ist, hybridisiert mit der cDNA auf der Membran. Die mRNA-Sequenzen der Gene, die nur unter den besonderen experimentellen Bedingungen exprimiert werden, finden auf der Membran keine komplementären Sequenzen und bleiben in Lösung. Sie werden anschließend in cDNA transkribiert, in



3.25 Durch subtraktive Hybridisierung lässt sich mRNA isolieren, die nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert wird

Es werden zwei unterschiedliche Kulturen angezogen, eine unter normalen Bedingungen (grün), die andere unter besonderen experimentellen Bedingungen (orange). Aus jeder Kultur wird die mRNA extrahiert und eine Probe in cDNA transkribiert (violett). Die cDNA wird auf einem Filter fixiert und denaturiert. Die experimentelle mRNA (orange) wird durch den Filter gesogen. Nur mRNA, die unter den besonderen experimentellen Bedingungen vorkommt, hybridisiert nicht und passiert den Filter. Umgekehrt wird jede mRNA, die unter beiden Wachstumsbedingungen in den Zellen vorhanden ist, von dem Filter abgefangen.

einen Vektor kloniert und sequenziert, um die Gene zu identifizieren, deren Expression unter hohen Temperaturen zunimmt.

Subtraktive Hybridisierung lässt sich einsetzen, um Gene zu identifizieren, die Krankheiten verursachen oder die nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden.

► Weiterführende Literatur

- Brown TA (2007) *Gentechnologie für Einsteiger*, 5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

DNA-Synthese

in vivo und *in vitro*

Einführung

Replikation der DNA

- Entwindung der DNA
- Priming der DNA-Synthese
- Struktur und Funktion der DNA-Polymerase
- Synthese des Folgestranges
- Fehlpaarungsreparatur nach der Replikation

Vergleich der Replikation bei „genetischen Einheiten“, Prokaryoten und Eukaryoten

DNA-Synthese *in vitro*

Chemische Synthese von DNA

Chemische Synthese von vollständigen Genen

Durch *in vitro*-DNA-Synthese lässt sich die Basensequenz ermitteln

Die Polymerasekettenreaktion nutzt die *in vitro*-Synthese, um geringe DNA-Mengen zu vermehren

Die automatisierte Zyklussequenzierung verknüpft PCR und Sequenzierung

Modifikationen der PCR-Technologie

Zufällig vervielfältigte polymorphe DNA

Reverse-Transkriptase-PCR

PCR in der Gentechnik

Weiterführende Literatur

Einführung

Bei der Replikation wird die gesamte genomische DNA vollständig entwunden und genau kopiert, sodass sie bei der Zellteilung auf die zwei Tochterzellen verteilt werden kann. Dieser komplexe und ausgeklügelte Prozess läuft in *E. coli* sehr schnell ab, die DNA-Polymerase kopiert etwa 1000 Nucleotide pro Sekunde, und auch in Eukaryoten sind es pro Sekunde noch 50 Nucleotide. Da viele Anwendungen in der Biotechnologie auf den Prinzipien der Replikation beruhen, werden in diesem Kapitel zunächst die Grundlagen der DNA-Replikation, wie sie in der Zelle stattfindet, behandelt. Anschließend gehen wir auf einige der in Gentechnik und Biotechnologie am häufigsten verwendeten Methoden ein, bei denen die DNA-Polymerase eingesetzt wird. Dazu gehören die chemische Synthese von DNA, die Polymerasekettenreaktion und die Sequenzierung von DNA.

Replikation der DNA

Um die Integrität eines Organismus zu erhalten, muss das gesamte Genom sehr genau repliziert werden. Selbst für das Fortbestehen von „genetischen Einheiten“ wie Plasmiden, Viren oder Transposons ist die Replikation von großer Bedeutung. Ein Schlüssel zum Verständnis der Verdopplung während der Zellteilung ist die komplementäre, doppelsträngige DNA-Struktur. Die doppelsträngige Helix wird entwunden, die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen lösen sich, und es entstehen zwei einzelne DNA-Stränge. Der Y-förmige Bereich der DNA wird als **Replikationsgabel** bezeichnet (Abb. 4.1). Die Replikation beginnt an einer spezifischen Stelle auf einem Chromosom, dem **Replikationsursprung** (*ori*). Dieser Ursprung wird bei *E. coli* als *oriC* bezeichnet und umfasst auf der DNA etwa 245 bp. Er besteht hauptsächlich aus A-T-Basenpaaren, da für deren Trennung weniger Energie erforderlich ist, als für G-C-Basenpaare.

Ist die Replikationsgabel eingerichtet, schließt sich ein großer Komplex aus Enzymen und Faktoren zusammen und synthetisiert die komplementären DNA-Stränge (s. Abb. 4.1). Die **DNA-Polymerase** beginnt auf einer Seite der Gabel mit der Synthese des komplementären Stranges, indem sie komple-

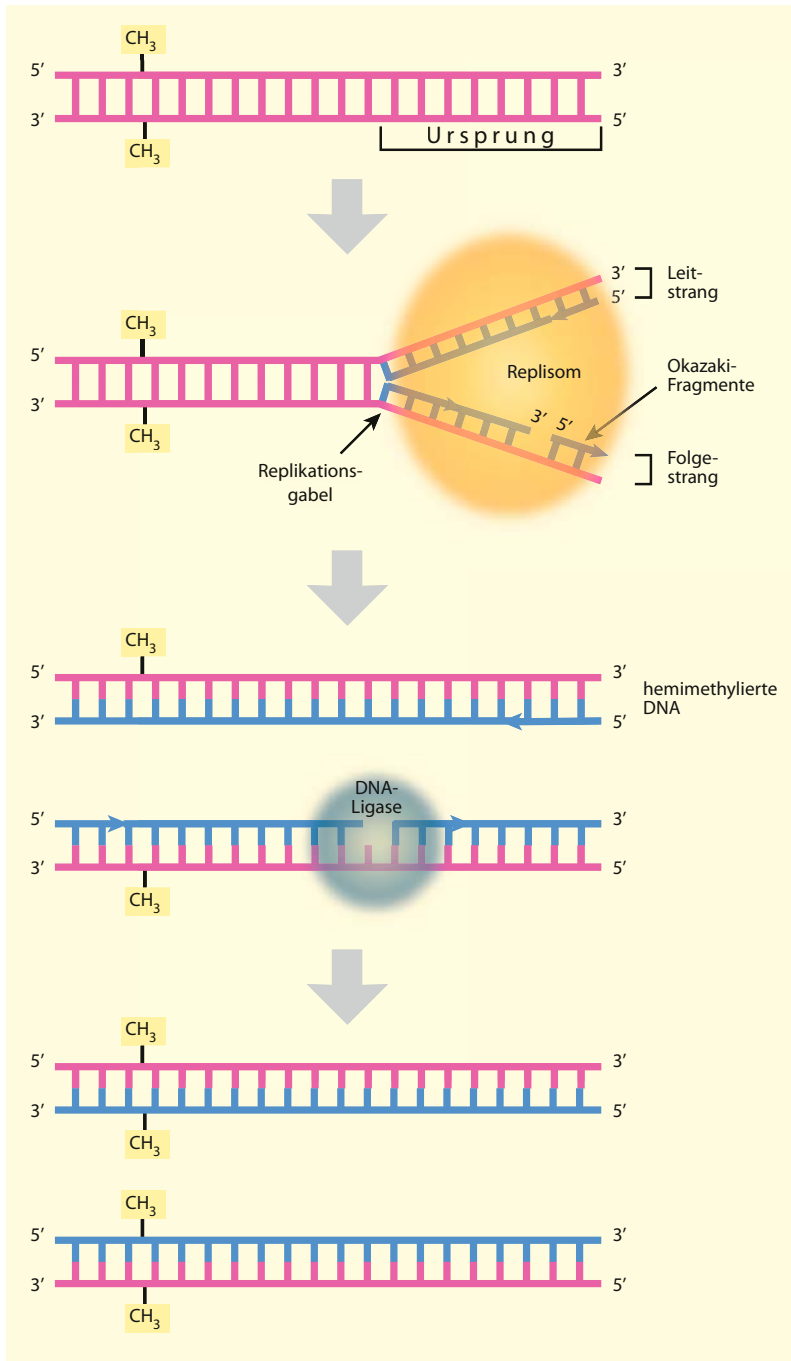
mentäre Nucleotide in 5'→3'-Richtung miteinander verknüpft. Dieser Strang, er wird als **Leitstrang** bezeichnet, wird kontinuierlich synthetisiert, da stets eine freie 3'-OH-Gruppe zur Verfügung steht, an die ein neues Nucleotid geknüpft werden kann. Weil die DNA-Polymerase nur in 5'→3'-Richtung synthetisieren kann, wird der andere Strang, der **Folgestrang**, in Form kleiner Fragmente (**Okazaki-Fragmente**) hergestellt. Die einzelnen Fragmente des Folgestranges werden durch das Enzym **DNA-Ligase** miteinander verbunden. Die Ligase verknüpft das 3'-OH mit dem 5'-PO₄ des benachbarten Nucleotids zu einer Phosphodiesterbindung. Der letzte Schritt ist die Anheftung von Methyl-(CH₃-)gruppen an den neuen Strang (s. unten). Ausgehend von der ursprünglichen doppelsträngigen Helix sind nun zwei identische doppelsträngige Helices entstanden, die jeweils einen Strang des Ausgangsmoleküls und einen neu synthetisierten Strang enthalten. Deshalb wird dieser Prozess auch als **semikonservative Replikation** bezeichnet.

Bei der Replikation synthetisiert die DNA-Polymerase den Leitstrang kontinuierlich, den Folgestrang jedoch in kleinen Okazaki-Fragmenten. Jede Kopie enthält einen Strang der ursprünglichen Helix und einen neu synthetisierten.

Entwindung der DNA

Da DNA in der Zelle superspiralisiert vorliegt, sind einige Enzyme notwendig, um die DNA zu öffnen und zu entspannen, bevor die Replikation beginnen kann (Abb. 4.2). **DNA-Helikase** und **DNA-Gyrase** heften sich nahe der Replikationsgabel an die DNA und entwinden die Stränge. Die DNA-Gyrase entfernt die Superspiralisierung und die Helikase entwindet die Doppelhelix, indem sie die Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Basenpaaren löst. Die beiden Stränge werden durch **einzelstrangbindende Proteine** (SSB) getrennt gehalten. Beide Stränge lagern sich daher nicht wieder aneinander, sondern der Replikationsursprung wird für Enzyme zugänglich und die Replikation beginnt.

Die DNA-Polymerase wandert die DNA entlang und vor der Replikationsgabel entsteht eine positive Superspiralisierung. Da das bakterielle Chromosom negativ superspiralisiert ist, entspannt sich die DNA dadurch anfangs. Nachdem jedoch etwa 5 % des Ge-

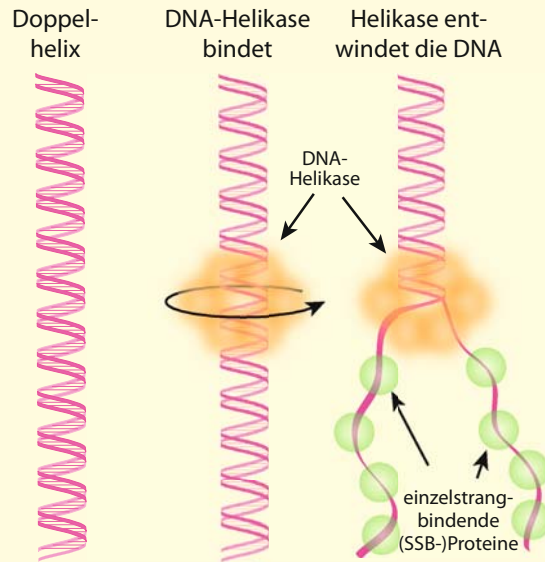
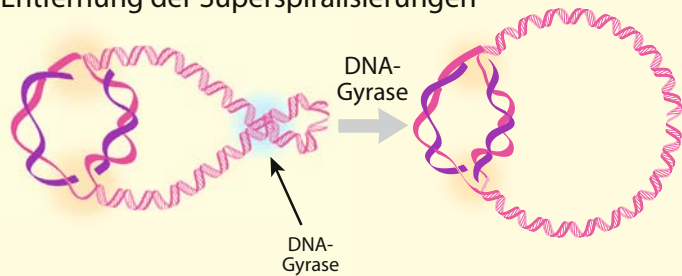
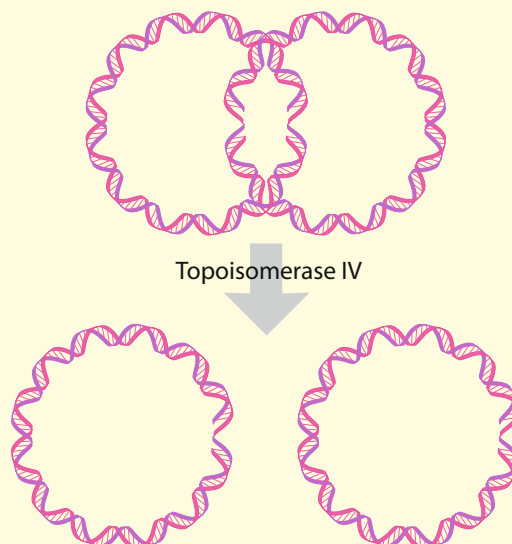


4.1 Replikation

Die Replikationsenzyme öffnen die Doppelhelix um den Replikationsursprung herum, sodass die DNA in diesem Bereich einzelsträngig wird. Die DNA-Polymerase fügt an jeden Strang in 5'→3'-Richtung komplementäre Nucleotide an; ein Strang wird daher kontinuierlich synthetisiert (Leitstrang), bei dem anderen Strang (Folgestrang) entstehen dagegen kurze Abschnitte, die man als Okazaki-Fragmente bezeichnet. Die DNA-Ligase schließt die Brüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat. Schließlich fügen Methylasen Methylgruppen an den neu synthetisierten Strang an.

noms repliziert wurde, nimmt die positive Superspiralisierung überhand und muss entfernt werden. Diese Aufgabe übernimmt die DNA-Gyrase, indem sie negative Superspiralisierungen einfügt. Werden ringförmige Chromosomen repliziert, dann können die beiden DNA-Kopien **Catenane** bilden und wie

die Glieder einer Kette miteinander verbunden sein. Das Enzym Topoisomerase IV beseitigt diese Strukturen, indem sie bei einem der Chromosomen Brüche in den Doppelstrang einfügt. Die zweite Kopie kann dann durch die erste gleiten und die Moleküle sind voneinander getrennt.

a Öffnen der DNA am Replikationsursprung**b Entfernung der Superspiralisierungen****c Entwirrung der Chromosomen****4.2 Entwindung der DNA**

a Öffnen des Replikationsursprungs. Helikasen binden an die DNA und brechen die Wasserstoffbrücken auf, die die beiden Stränge zusammenhalten. Anschließend binden SSBs an die freiliegenden Stränge und verhindern so, dass sie sich wieder aneinanderlagern. **b** Entfernen der Superspiralisierung. Damit die Replikationsenzyme an dem ganzen Chromosom entlanggleiten können, muss die DNA-Gyrase die Superspiralisierung beseitigen. **c** Entwirren der Chromosomen. Nachdem die Replikation von ringförmigen Chromosomen abgeschlossen ist, sind die beiden Tochterringe gelegentlich wie die Glieder einer Kette miteinander verbunden. Die Topoisomerase IV entwirrt die beiden Chromosomen, damit sie auf die Tochterzellen aufgeteilt werden können.

DNA-Helikase, DNA-Gyrase und Topoisomerase IV entwinden und entwirren die superspiralisierte DNA während der Replikation.

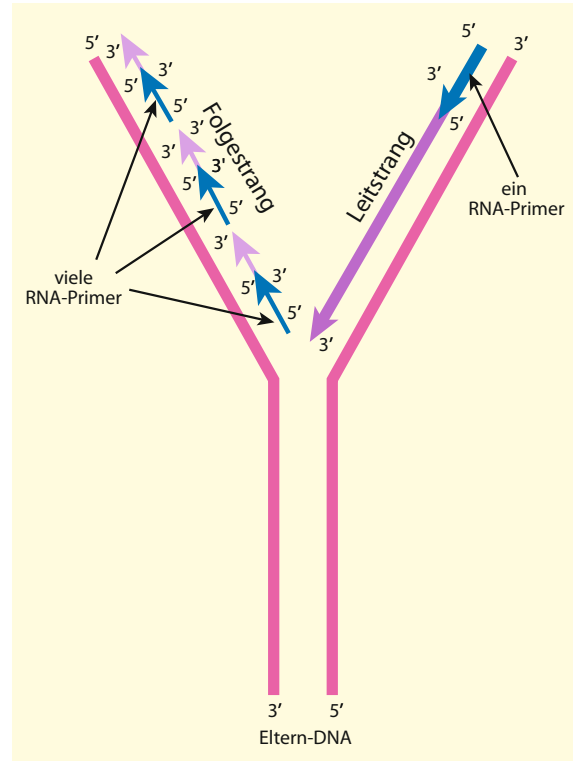
Priming der DNA-Synthese

An dem geöffneten Replikationsursprung wird das **Replisom** zusammengesetzt. Es enthält die Enzyme für die Synthese des Leit- und Folgestranges sowie die Helikase und die SSB-Proteine. Im Gegensatz zur RNA-Polymerase benötigt die DNA-Polymerase eine 3'-OH-Gruppe, an die die neuen Nucleotide angefügt werden können; die DNA-Polymerase verlängert einen Nucleinsäurestrang, beginnt aber nicht neu mit der Synthese. Aus diesem Grund wird zunächst ein 10 bis 12 bp langer RNA-Primer synthetisiert, von dem ausgehend die DNA-Polymerase den DNA-Strang herstellt. Am Replikationsursprung ersetzt ein Protein namens **PriA** die SSB-Proteine, sodass eine spezielle RNA-Polymerase, die **Primase** (DnaG), hinzutreten und Ribonucleotide zu einem kurzen RNA-Primer verknüpfen kann. Die Primase synthetisiert am Ursprung einen einzelnen Primer für den Leitstrang, für den Folgestrang stellt das Enzym dagegen viele Primer her. Nun binden zwei Moleküle DNA-Polymerase III an die Primer des Leit- und Folgestranges und synthetisieren ausgehend von den 3'-OH-Gruppen neue DNA (Abb. 4.3).

Primase, eine spezielle RNA-Polymerase, entfernt mithilfe von PriA die SSB-Proteine und synthetisiert am Replikationsursprung einen kurzen RNA-Primer. Die DNA-Polymerase beginnt anschließend, ausgehend von der 3'-OH-Gruppe des Primers, mit der Synthese des neuen DNA-Stranges. Für die Synthese des Folgestranges wiederholt sich dieser Ablauf vielfach.

Struktur und Funktion der DNA-Polymerase

Die **DNA-Polymerase III (PolIII)** ist die wichtigste DNA-Polymerase, sie ist bei der Replikation des bakteriellen Chromosoms aktiv. Das Enzym besteht aus mehreren Untereinheiten (Abb. 4.4). Die **Gleitkammer** ist ein ringförmiges Protein, das aus ei-



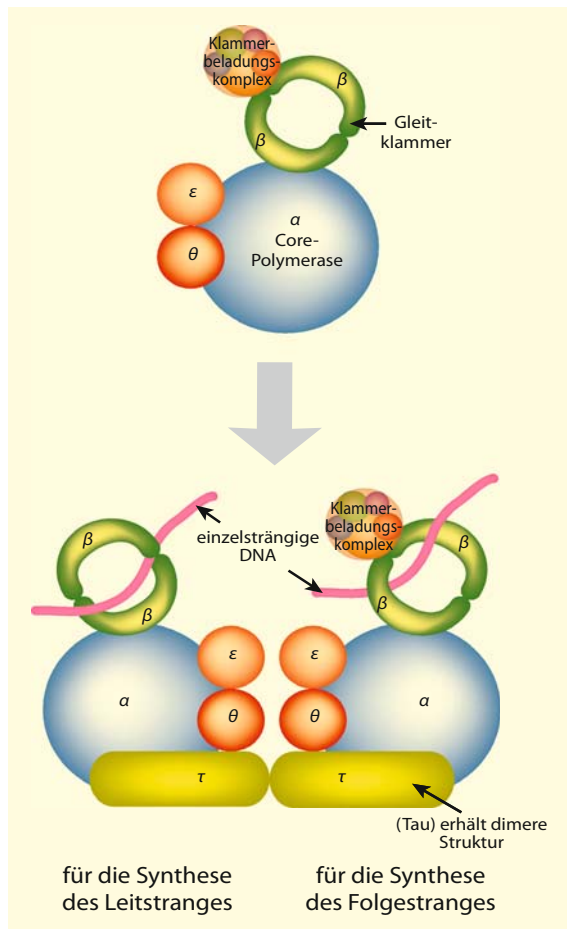
4.3 Die Strangsynthese erfordert einen RNA-Primer

Die DNA-Polymerase kann nicht ohne eine freie 3'-OH-Gruppe mit der Synthese eines neuen DNA-Stranges beginnen. Die DNA-Replikation erfordert daher die Synthese eines RNA-Primers, damit die Strangsynthese beginnen kann. Für den Leitstrang ist ein RNA-Primer notwendig, für den Folgestrang sind es viele.

nem Dimer aus DnaN-Proteinen besteht. An der Replikationsgabel legt sich mithilfe eines Clusters aus Hilfsproteinen, des **Klammerbeladungskomplexes**, je eine Klammer um einen DNA-Strang. Die beiden Gleitklammern binden an die beiden Core-Enzyme, von denen sich auf jedem DNA-Strang eines befindet. Ein **Core-Enzym** besteht aus drei Untereinheiten: DnaE (α -Untereinheit), das die Nucleotide miteinander verknüpft, DnaQ (ϵ -Untereinheit), das die Korrekturlesefunktion übernimmt, und HolE (θ -Untereinheit) mit unbekannter Funktion. Beginnt die α -Untereinheit mit dem Verknüpfen der Nucleotide, dann erkennt die ϵ -Untereinheit die bei einer möglichen Fehlpaarung entstehenden Spannungen und entfernt die fehlgepaarte Base. Anschließend wird ein passendes Nucleotid eingefügt. Die DNA-Polymerase III aus Bakterien kann bis zu 1000 bp

pro Sekunde polymerisieren und besitzt daher eine außerordentlich hohe Enzymaktivität.

Die vielen Untereinheiten der DNA-Polymerase III arbeiten bei der Synthese eines neuen DNA-Stranges zusammen. Das Core-Enzym besteht aus zwei essenziellen Untereinheiten: der α -Untereinheit, die die Nucleotide miteinander verknüpft, und der ϵ -Untereinheit, die sicherstellt, dass die Verknüpfung korrekt ist.

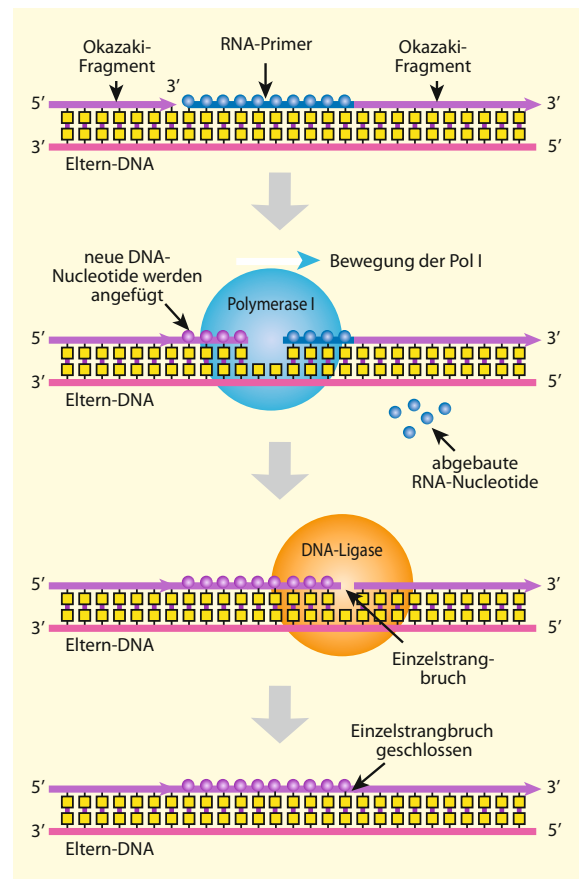


4.4 DNA-Polymerase III – der Zusammenbau der Untereinheiten

Im oberen Teil der Abbildung ist eine einzelne Core-Untereinheit dargestellt, der untere Teil zeigt, wie sich diese Einheit mit einer weiteren Untereinheit zu einem Dimer zusammensetzt. Die dimere Untereinheit enthält nur einen Klammerbeladungskomplex, der mit der Syntheseeinheit für den Folgestrang verbunden ist. Die beiden Core-Proteine werden durch die τ -Untereinheit miteinander verbunden.

Synthese des Folgestranges

Unmittelbar nach der Synthese des neuen Folgestranges ist dieser von vielen RNA-Abschnitten, den ehemaligen RNA-Primern, unterbrochen und es finden sich viele **Einzelstrangbrüche** entlang des Rückgrats, die geschlossen werden müssen (Abb. 4.5). Eine Möglichkeit ist, dass die RNaseH die RNA-Primer aus dem Folgestrang entfernt und die DNA-Polymerase I diese Bereiche mit einzelsträngiger DNA auffüllt. Alternativ kann die DNA-Polymerase I die RNA-Primer auch an den Einzelstrangbrüchen erkennen und dann den Bereich etwa 10 Nucleotide stromabwärts



4.5 Verknüpfung der Okazaki-Fragmente

Direkt nach der Synthese besteht der Folgestrang aus einer Reihe von sich abwechselnden Okazaki-Fragmenten und RNA-Primern. Nun bindet die DNA-Polymerase I an die Primerregion, beginnt an der DNA entlang zu wandern, baut dabei die RNA ab und ersetzt sie durch DNA. Nun schließt die DNA-Ligase die Einzelstrangbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat.

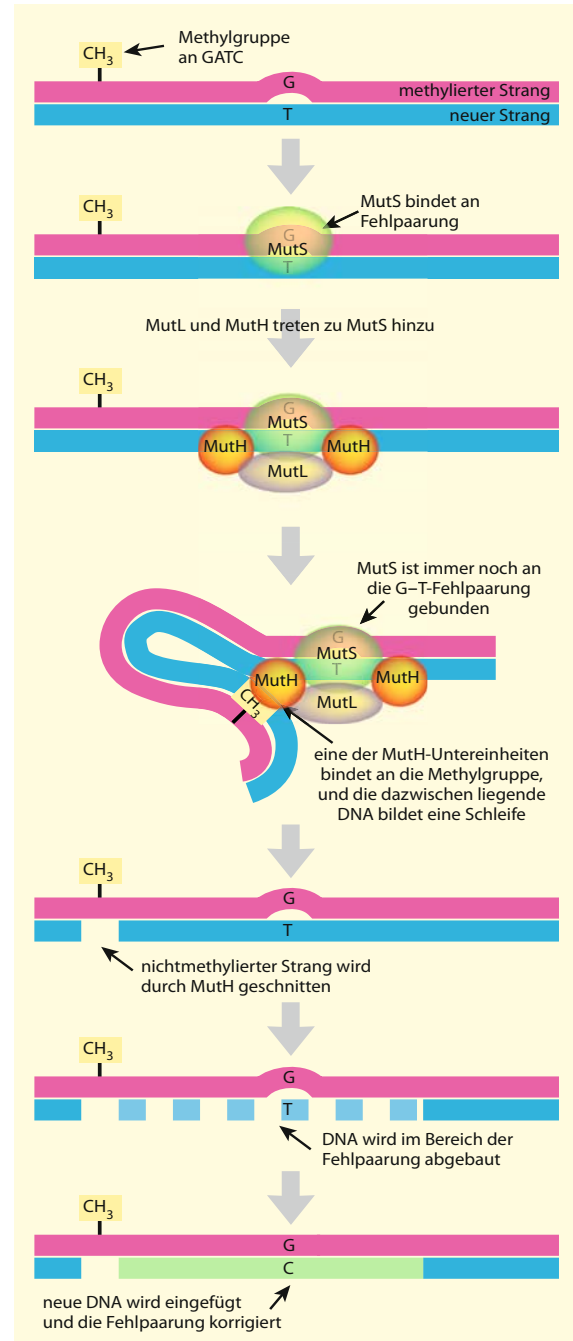
des Bruches durch DNA ersetzen. Anschließend werden die DNA-Fragmente des Folgestranges durch eine von der DNA-Ligase katalysierte Ligrationsreaktion miteinander verbunden. Sowohl die DNA-Polymerase I als auch die DNA-Ligase sind wichtige Enzyme in der Molekularbiologie und werden in der Biotechnologie häufig verwendet.

Da der Folgestrang in kleinen Stücken synthetisiert wird, müssen entweder DNA-Polymerase I oder RNaseH die vielen RNA-Primer-Bereiche ausschneiden und durch DNA ersetzen. Die DNA-Ligase schließt dann die Einzelstrangbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat des neuen DNA-Stranges.

Fehlpaarungsreparatur nach der Replikation

Nachdem die Replikation abgeschlossen ist, korrigiert das **Fehlpaarungsreparatursystem** Fehler der DNA-Polymerase. Wurde eine falsche Base eingebaut und hat die DNA-Polymerase den Schaden nicht selbst beseitigt, bildet sich an dieser Stelle der Helix eine kleine Auswölbung. Doch welche der beiden gegenüberliegenden Basen ist korrekt und welche wurde falsch eingebaut? Naheliegender ist, dass die Base im neuen Strang falsch ist, während es sich bei der Base im Elternstrang um die richtige handelt. Das Fehlpaarungsreparatursystem von *E. coli* (MutSHL) erkennt den Originalstrang anhand der Methylierung. Unmittelbar nach der Replikation ist die DNA **hemimethyliert**, d.h., der alte Strang besitzt Methylgruppen, die an verschiedene Basen geheftet sind, doch der neue Strang wurde noch nicht methyliert (s. Abb. 4.1). Einige dieser Methylgruppen schützen gegen Restriktionsenzyme, die von Bakterien synthetisiert werden (s. Kap. 3), andere kennzeichnen den Elternstrang der DNA. Für die Anheftung des zweiten Typs von Methylgruppen sind in *E. coli* zwei Enzyme verantwortlich: **DNA-Adenin-Methylase (Dam)** verknüpft Methylgruppen mit dem Adenin in der Sequenz GATC, und **DNA-Cytosin-Methylase (Dcm)** hängt eine Methylgruppe an das Cytosin in CCAGG oder CCTGG. Diese Enzyme methylieren den neuen Strang nach der Replikation, doch sie sind langsam. Dadurch bleibt dem Reparatursystem ausreichend Zeit, die Fehler zu finden und zu reparieren.

Drei Gene von *E. coli* sind für die Fehlpaarungsreparatur zuständig: *mutS*, *mutL* und *mutH* (Abb. 4.6).



4.6 Fehlpaarungsreparatur nach der Replikation

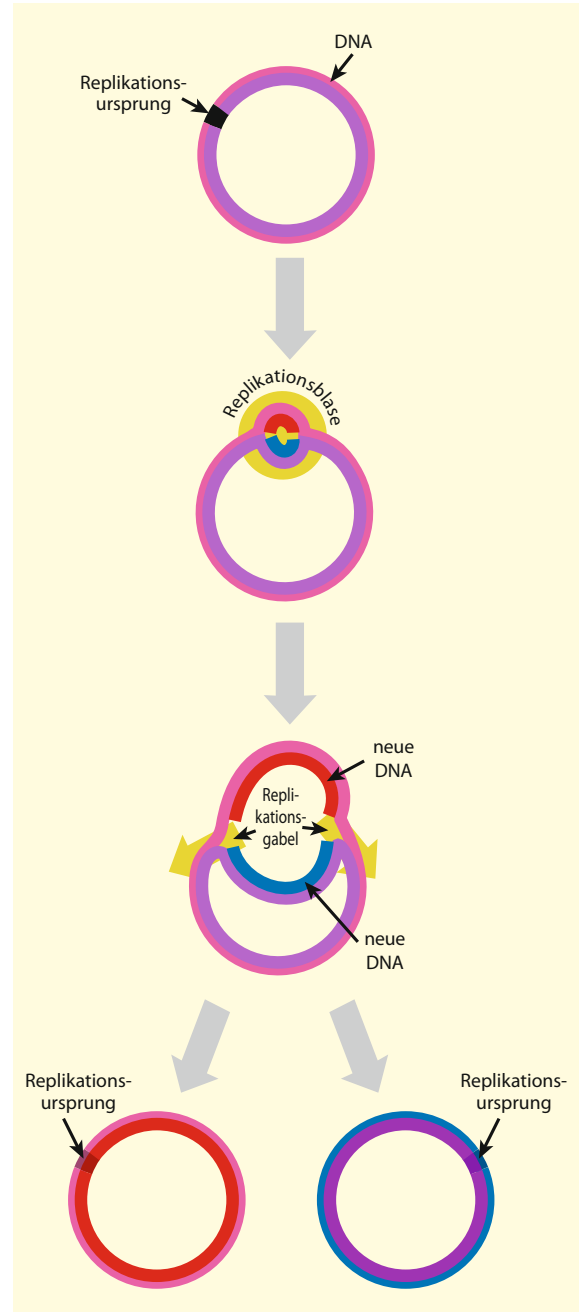
MutS erkennt kurz nach der DNA-Replikation einen Fehler in der Basenpaarung. MutS lenkt das MutL- und zwei MutH-Proteine zu der Stelle mit der Fehlpaarung. MutH erkennt das am nächsten gelegene GATC des neuen Stranges an der Methylgruppe, die an den Elternstrang geheftet ist. MutH schneidet den nichtmethylierten Strang und die DNA zwischen dem Schnitt und der Fehlpaarung wird abgebaut. Der Bereich wird ersetzt und der Fehler ist korrigiert.

Das MutS-Protein erkennt die Auswölbung oder Spannung in der Struktur. MutH findet die nächste GATC-Sequenz und fügt einen Einzelstrangbruch in den nichtmethylierten, d.h. neu synthetisierten Strang ein. MutL bringt MutS (mit der Fehlpaarungsstelle) und MutH (mit GATC), die weit voneinander entfernt liegen können, in eine räumliche Nähe. Schließlich wird die DNA des neuen Stranges von der DNA-Polymerase III abgebaut und durch die korrekte Sequenz ersetzt.

In *E. coli* erkennen die für die Fehlpaarungsreparatur verantwortlichen Proteine (MutSHL) eine bei der Replikation entstandene fehlerhafte Basenpaarung. Sie schneiden die neuen Nucleotide um diese Fehlpaarungsstelle herum aus und dirigieren die DNA-Polymerase III zu der nun einzelsträngigen Region, damit ein neuer, korrekter Strang synthetisiert werden kann.

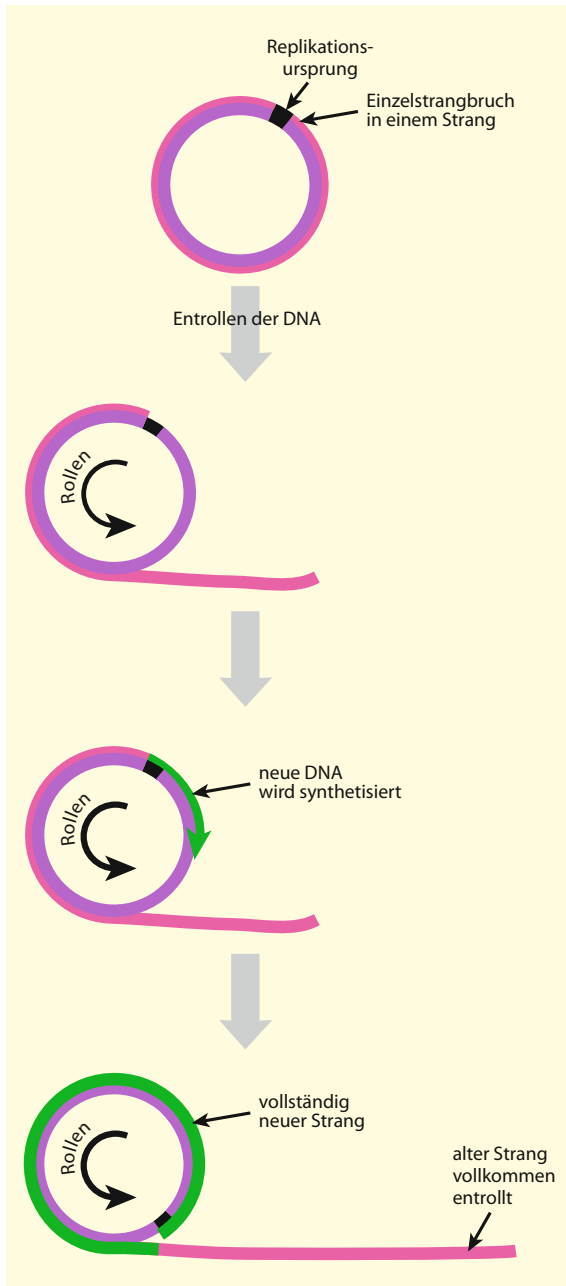
Vergleich der Replikation bei „genetischen Einheiten“, Prokaryoten und Eukaryoten

Obwohl der grundlegende Mechanismus der Replikation bei den meisten Organismen gleich ist, sind der Zeitpunkt, die Richtung und die Stellen für Initiation und Termination doch sehr variabel. Die wesentlichen Unterschiede bei der Replikation ergeben sich hauptsächlich aufgrund der ringförmigen bzw. linearen Struktur des Genoms. Normalerweise ist die DNA-Replikation in Pro- und Eukaryoten bidirektional, unabhängig davon, ob das Genom linear oder ringförmig ist. Die beiden Replikationsgabeln wandern in entgegengesetzte Richtungen und entwinden dabei die DNA. In Bakterien wie *E. coli* gibt es nur einen Replikationsursprung, *oriC*. Die Replikation findet entlang des ringförmigen Chromosoms in beide Richtungen statt, bis sich die Gabeln auf der gegenüberliegenden Seite des Chromosoms, dem Terminus (*terC*) treffen. Ist die Hälfte des Chromosoms repliziert, ähnelt die Struktur dem griechischen Buchstaben θ , weshalb diese Art der Replikation auch als **θ -(theta)-Replikation** bezeichnet wird (Abb. 4.7). Aus dem einen ringförmigen Chromosom sind schließlich zwei Moleküle entstanden. Die θ -Replikation kommt auch bei vielen Plasmiden vor, wie dem F-Plasmid von *E. coli*, wenn die Zel-



4.7 θ -Replikation

In ringförmigen Genomen oder Plasmiden erkennen die Replikationsenzyme den Replikationsursprung, entwinden die DNA und die Synthese von zwei neuen DNA-Strängen beginnt, wobei in jede Richtung ein Strang synthetisiert wird. Es entsteht eine Replikationsblase, die dem Chromosom oder Plasmid eine Ähnlichkeit mit dem griechischen Buchstaben θ (theta) verleiht. Die beiden Replikationsgabeln wandern den Ring entlang, bis sie an der gegenüberliegenden Seite aufeinander treffen.



4.8 Rolling circle-Replikation

Bei der *rolling circle*-Replikation wird in einen Strang des Plasmids oder der viralen DNA ein Bruch eingefügt und der gesplante Strang (rosa) trennt sich vom ringförmig geschlossenen Strang (violett). Die Lücke, die bei dieser Trennung zurückbleibt, wird nun mit neuer DNA (grün) gefüllt, deren Synthese am Replikationsursprung beginnt. Die neu synthetisierte DNA ersetzt fortlaufend den linearen Strang, bis der zu einem Ring geschlossene Strang komplett repliziert ist. Der lineare Einzelstrang wird bei diesem Prozess vollständig „abgerollt“.

len asexuell wachsen und sich teilen (im Gegensatz zur Übertragung des Genoms auf eine andere Zelle durch Konjugation).

Einige Plasmide und viele Viren replizieren ihre Genome durch einen Prozess, den man als **rolling circle-Replikation** bezeichnet (Abb. 4.8). Am Replikationsursprung wird einer der beiden DNA-Stränge gespalten und abgerollt. Die DNA wird ausgehend vom Replikationsursprung synthetisiert. Der ringförmige Strang dient der DNA-Polymerase als Matrize, wenn das Enzym an diesem Strang entlang wandert. Währenddessen ragt der andere Elternstrang frei in das Cytoplasma, wird entfernt, zu einem neuen Ring geschlossen und schließlich ein zweiter Strang synthetisiert. Dadurch entstehen zwei Ringe aus Plasmid- oder viraler DNA, jeder besteht aus einem ursprünglichen und einem neu synthetisierten DNA-Strang.

Die *rolling circle*-Replikation kommt bei einigen viralen Genomen vor. Die Replikation ist jedoch nicht nach einer Runde beendet, sondern der Ring wird fortlaufend umkreist, und es werden mehr und mehr Kopien synthetisiert, die alle aneinander hängen und als Einzelstrang im Cytoplasma liegen. Der lange Strang neuer DNA kann, abhängig von dem Virustyp, zu einem Doppelstrang vervollständigt werden oder einzelsträngig bleiben. Schließlich wird der freie Strang zu Einheiten in Genomgröße zerschnitten und in Viruspartikel verpackt. Einige Viren schließen diese Kopien vor der Verpackung zu einem Ring, andere lassen sie linear.

Besonders problematisch ist die Replikation von längeren linearen DNA-Molekülen wie den Chromosomen des Menschen. Insbesondere die Enden sind schwierig zu replizieren, weil sich an den Chromosomenenden RNA-Primer befinden. Wird der Primer durch eine Exonuclease (MF1) entfernt, dann gibt es kein stromaufwärts liegendes freies 3'-OH-Ende, an das neue Nucleotide angefügt werden können, um die Lücke zu schließen. (In Eukaryoten gibt es keine Entsprechung zur DNA-Polymerase I mit ihrer Doppelfunktion. Eine unabhängige Exonuclease, MF1, entfernt die RNA-Primer und die DNA-Polymerase δ füllt die Lücken.) Über viele Replikationsrunden hinweg verkürzen sich die Enden der linearen Chromosomen immer weiter. An den Enden jedes linearen Chromosoms befinden sich spezielle Strukturen, die man als **Telomere** bezeichnet und die verhindern, dass sich die Verkürzung der Chromosomen auf wichtige Gene auswirkt. Telomere bestehen aus vielen Tandemwiederholungen einer kurzen Sequenz (beim Menschen

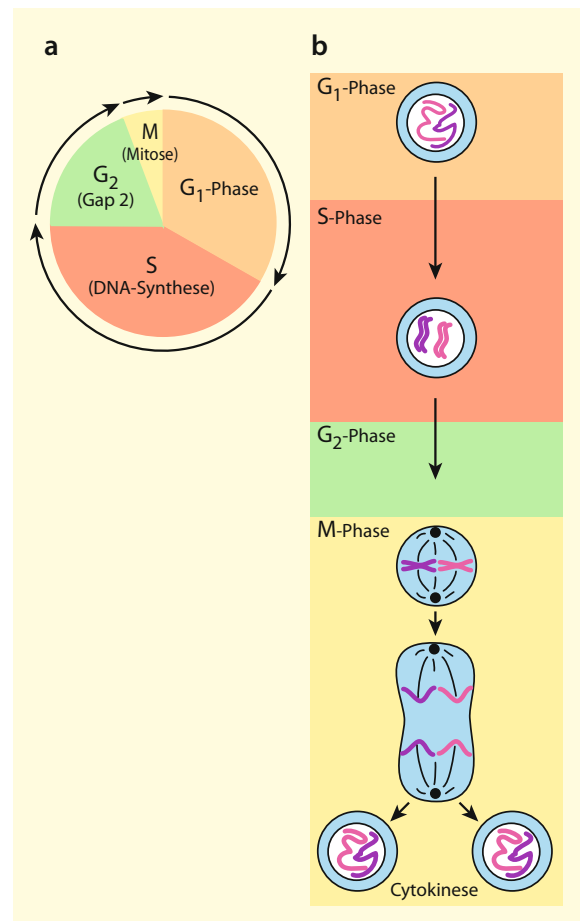
TTAGGG). Das Enzym **Telomerase** vermag die Telomere zu regenerieren, indem es eine RNA-Matrize für die Synthese neuer Sequenzwiederholungen nutzt. Dieses geschieht nur in einigen Zellen; in anderen verkürzen sich die Telomere jedes Mal, wenn die Zelle ihre DNA repliziert. Eine Theorie geht davon aus, dass die Telomerverkürzung eine molekulare Uhr ist, die das Alter der Zelle registriert und schließlich einen Selbstmord der Zelle auslöst (s. Kap. 20).

Die Länge der linearen Chromosomen stellt ebenfalls ein Problem dar. Die Zeit, die die Synthese eines ganzen menschlichen Chromosoms in Anspruch nehmen würde, wäre zu lang, würde die Replikation nur an einem einzigen Ursprung beginnen. Um dieses Problem zu lösen, gibt es viele Replikationsursprünge, und von jedem geht die Replikation in beide Richtungen aus. Die Stränge werden synthetisiert, bis sie auf einen neuen, in die andere Richtung synthetisierten Strang treffen.

Auch die Zellstruktur von Eukaryoten wirft einige Probleme für die Replikation auf. (In Bakterien wird das Chromosom einfach repliziert, die beiden Kopien wandern an die Zellpole, und in der Mitte wird eine neue Zellwand eingezogen. Weder Kernmembranen noch Organellen, die sich teilen müssten, sind vorhanden; es gibt nur das Chromosom und möglicherweise ein paar Plasmide.) In Eukaryoten existiert dagegen ein spezifischer **Zellzyklus** mit vier Phasen, die Replikation findet nur während einer bestimmten Phase statt (Abb. 4.9). Die G_1 -Phase ist die Phase vor der DNA-Synthese. Sie ist unterschiedlich lang und beträgt für Hefe etwa 25 Minuten. Die nächste Phase ist die S- oder Synthesephase, in der das gesamte Genom repliziert wird. Diese Phase ist in der Regel am längsten und dauert in Hefe etwa 40 Minuten. Es folgt die dritte Phase, die G_2 -Phase, eine weitere Ruhephase vor der Mitose, der M-Phase. Während der Mitose teilt die Zelle ihre Zellwand und die Membranen auf zwei separate Zellen auf, und auch die neuen Chromosomen und die anderen Zellkomponenten werden auf die beiden Tochterzellen verteilt. Das Signal für die Zellteilung ist von vielen Faktoren wie Umgebung, Größe und Alter abhängig; vieles ist noch unbekannt.

Die eukaryotische Mitose ist ein dynamischer Prozess, bei dem sich zelluläre Komponenten an neue Positionen in der Zelle bewegen. Bevor sich die Chromosomen nach der Replikation trennen und zu den entgegengesetzten Zellpolen wandern können, muss sich die Kernmembran auflösen. Die Chromo-

somen sind über spezifische Sequenzen, die man als **Centromere** bezeichnet, an lange Fasern gebunden, die die **Spindel** bilden. Die Centromere gleiten die Spindelfasern entlang bis sie die Zellpole erreichen. Und auch andere Zellkomponenten wie Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum, Lysosomen usw. werden zwischen den Tochterzellen aufgeteilt. Schließlich bildet sich eine neue Kernmembran um die Chromosomen jeder Tochterzelle. Die Dynamik dieses Prozesses wird immer noch untersucht und man findet immer noch neue Proteine und Moleküle, die in den unterschiedlichen Phasen der Mitose eine Rolle spielen.



4.9 Der eukaryotische Zellzyklus

Die DNA-Replikation findet während der S-Phase des Zellzyklus statt, doch die Chromosomen werden zu einem späteren Zeitpunkt, während der M- oder Mitosephase, voneinander getrennt. Zwischen S- und M-Phase liegen G_1 und G_2 .

Bakterien und Viren nutzen entweder die θ -Replikation oder den *rolling circle*-Mechanismus, um ihr Genom zu duplizieren.

Eukaryotische Zellen enthalten Chromosomen mit einer Vielzahl von Replikationsursprüngen. In bestimmten Zellen schützen Telomere die Chromosomenenden, weil sich die DNA sonst bei jeder Replikationsrunde verkürzen würde. In Eukaryoten findet die Replikation ausschließlich zu bestimmten Zeitpunkten während des Zellzyklus statt.

DNA-Synthese *in vitro*

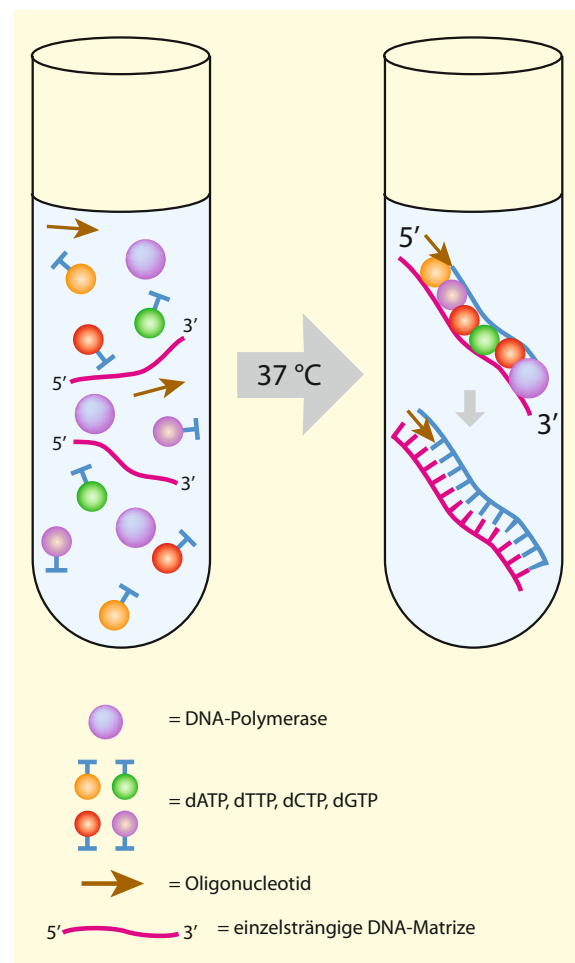
Die Synthese von DNA im Labor beruht auf denselben grundlegenden Prinzipien, die für die Replikation beschrieben wurden (Abb. 4.10). Für die DNA-Replikation sind folgende Komponenten wichtig: Enzyme, die die Doppelhelix öffnen, ein RNA-Primer mit einer freien 3'-OH-Gruppe, ein Gemisch aus Nucleotiden und die DNA-Polymerase, um die Anheftung und Verknüpfung neuer Nucleotide zu katalysieren.

Um eine DNA-Replikation im Labor durchführen zu können, sind ein paar Abwandlungen des Prozesses notwendig. So fehlen z.B. die Enzyme für die Öffnung und Entwindung der DNA-Matrize. Stattdessen wird die doppelsträngige DNA durch Hitze oder eine starke Base, die die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen lösen, in einzelsträngige DNA überführt. Alternativ zu diesem Verfahren werden auch Viren eingesetzt, die ihre DNA in einzelsträngiger Form verpacken. So vervielfältigt z.B. der *E. coli*-infizierende Bakteriophage M13 sein Genom mithilfe des *rolling circle*-Mechanismus und verpackt die einzelsträngige DNA in Viruspartikel, die ohne eine Lyse der Wirtszelle freigesetzt werden. Wird die DNA-Matrize in das M13-Genom kloniert, dann wird auch sie als Einzelstrang verpackt. Diese DNA lässt sich direkt aus den Viruspartikeln isolieren.

Ebenso fehlt bei der DNA-Synthese im Labor ein RNA-Primer, da RNA relativ instabil ist und leicht abgebaut wird. Stattdessen verwendet man als Primer ein kurzes einzelsträngiges Oligonucleotid aus DNA. (Solange der Primer ein freies 3'-OH-Ende zur Verfügung stellt, wird die DNA-Polymerase dieses Ende als Anknüpfungspunkt verwenden, unabhängig davon, ob es sich um RNA oder DNA handelt.) Die Primer werden chemisch synthetisiert (s. unten) und

zu der einzelsträngigen DNA-Matrize gegeben. Die Sequenz des Oligonucleotid-Primers ist komplementär zu einer kurzen Sequenz auf der DNA-Matrize. Für die Primersynthese darf die Sequenz der Matrize daher nicht vollkommen unbekannt sein. Ist das jedoch der Fall, dann kann man die Matrize zunächst in einen Vektor klonieren und anschließend die nahe der klonierten DNA liegenden, bekannten Vektorsequenzen (wie den Bereich um den Polylinker) für die Primersynthese nutzen.

Schließlich wird eine gereinigte DNA-Polymerase mit einem Gemisch aus Nucleotiden (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) zu Matrize und Primer gegeben.



4.10 DNA-Synthese *in vitro*

Für die DNA-Synthese im Labor sind eine einzelsträngige DNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Oligonucleotid-Primer und Nucleotide notwendig. Die Synthese findet statt, wenn das Gemisch aus allen Komponenten bei der geeigneten Temperatur inkubiert wird.

Der Primer lagert sich an die komplementäre Sequenz auf der Matrize und wird von der DNA-Polymerase verlängert, wodurch ein neuer DNA-Strang entsteht, der zur DNA-Matrize komplementär ist.

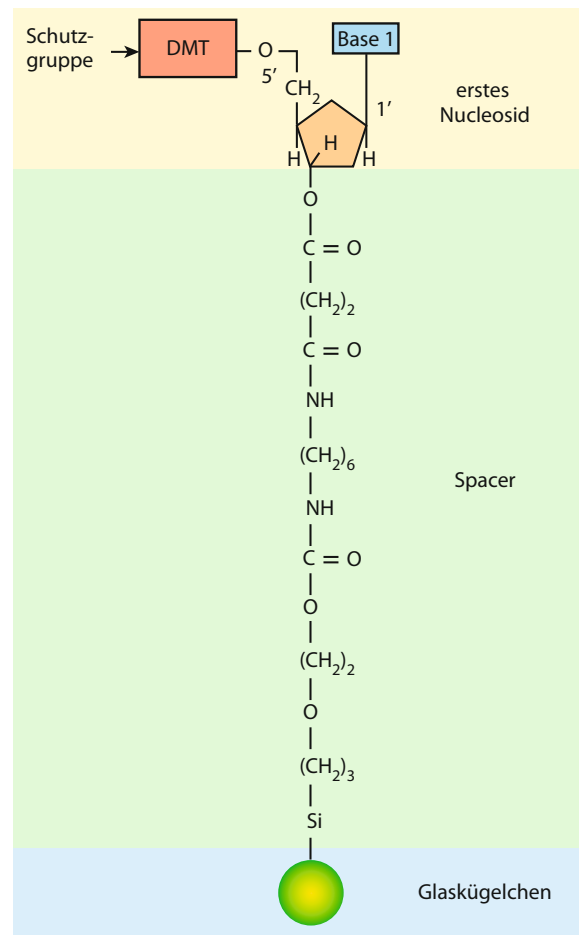
Die *in vitro*-Replikation erfordert eine einzelsträngige DNA-Matrize, einen Primer, Nucleotide und die DNA-Polymerase.

Chemische Synthese von DNA

Die Synthese von DNA auf chemischem und nicht auf biologischem Wege war eine der ersten Technologien, die in der Biotechnologie industriell angewendet wurden. Für den Einsatz der DNA-Replikation im Labor ist die Synthese eines kurzen DNA-Abschnittes unerlässlich. Die DNA-Polymerase kann DNA nicht ohne ein freies 3'-OH-Ende verlängern. Um das Enzym *in vitro* nutzen zu können, muss daher ein kurzer Primer zugegeben werden. Solche Primer werden bei der DNA-Sequenzierung (s. unten), bei der Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA mithilfe der PCR (s. unten) und für das Screening von Bibliotheken (s. Kap. 3) eingesetzt. Aus diesem Grund behandeln wir im Folgenden kurz die Synthese von Primern.

Bereits kurz nachdem Watson und Crick ihre Ergebnisse zur Kristallstruktur der DNA veröffentlicht hatten, war man bestrebt, die chemische Synthese von DNA zu etablieren. H. Gobind Khorana von der University of Chicago war ein Pionier auf dem Gebiet der Synthese von **Oligonucleotiden**. Rein technisch gesehen sind Oligonucleotide DNA-Stücke mit einer Länge von weniger als 20 Nucleotiden. Heute bezeichnet der Begriff „Oligonucleotid“ allgemein einen kurzen, chemisch synthetisierten DNA-Abschnitt. Im Jahr 1970 synthetisierten Khoranas Mitarbeiter ein aktives tRNA-Molekül mit einer Länge von 72 Nucleotiden (Agarwal et al 1970). Die chemischen Reaktionen, die sie nutzten, waren ineffizient und umständlich, doch einige von Khoranas Ideen finden sich auch heute noch bei der Oligonucleotidsynthese wieder. Heutzutage ist das Verfahren automatisiert und wird von einem **DNA-Syntheseapparat** durchgeführt, der ein Nucleotid nach dem anderen in einer spezifischen Abfolge miteinander verknüpft.

Im Gegensatz zur DNA-Synthese *in vivo*, wird die automatisierte Synthese in 3'→5'-Richtung durchgeführt. Der erste Schritt ist die Verknüpfung des ersten Nucleosids (einem Nucleosid fehlt im Gegensatz zu einem Nucleotid die Phosphatgruppe am C5-Atom der Pentose) an ein poröses Glaskügelchen. Dieses besteht aus Glas mit kontrollierter Porosität, dem sogenannten **controlled pore glass (CPG)**. Das erste Nucleosid wird allerdings nicht direkt angeheftet, sondern ist über ein Spacermolekül, das an die 3'-OH-Gruppe des Nucleosids bindet, an dem Glaskügelchen fixiert (Abb. 4.11). Die Kügelchen befinden sich in einer Säule, sodass sich die Reagenzien leicht zugeben und auch wieder auswaschen lassen. (Die Verwendung von CPG ist eine Verbesserung im Vergleich zu Kho-



4.11 Addition von Spacermolekülen und der ersten Base an das CPG

Das erste Nucleosid ist über seine 3'-OH-Gruppe an ein Spacermolekül gebunden, das wiederum an ein Glaskügelchen gekoppelt ist.

ranas Technologie. Er nutzte Polymerkügelchen, doch das Polymer quoll auf, wenn man die Reagenzien auf die Säule gab, wodurch die Synthese behindert wurde. CPG quillt dagegen nicht.)

Bevor der Spacer mit der 3'-OH-Gruppe des Nucleosids verbunden wird, wird eine Schutzgruppe mit dessen 5'-OH-Ende verknüpft, sodass die 3'-OH-Gruppe als einzige reaktive Gruppe zur Verfügung steht. Khoranas Synthese war revolutionär, weil er als Schutzgruppe eine **Dimethoxytrityl-(DMT-)gruppe** wählte, die auch heute noch eingesetzt wird. DMT ist stark orange gefärbt und lässt sich von der 5'-OH-Gruppe leicht entfernen, sodass das nächste Nucleotid

mit dem ersten Nucleosid verknüpft werden kann. In der Praxis wird das Konstrukt aus CPG-Spacer-erstes Nucleosid gewaschen und anschließend die DMT-Gruppe mit einer schwachen Säure wie Trichloressigsäure (TCA) entfernt. Die 5'-OH-Gruppe liegt nun frei, um mit dem nächsten Nucleotid verknüpft zu werden. Die Effizienz bei der Entfernung des DMT ist ein kritischer Punkt. Wird DMT nicht vollständig beseitigt, dann werden die potenziellen Oligonucleotide nicht verlängert. Die orange Farbe zeigt die Effizienz an und lässt sich leicht optisch messen.

Jedes Nucleotid wird als sein **Phosphoramidit** (genauer Nucleosidphosphoramidit) angefügt, das aus ei-

Exkurs 4.1

Khorana, Nirenberg und Holley

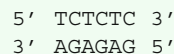
Har Gobind Khorana, Marshall W. Nirenberg und Robert W. Holley sind Pioniere auf dem Gebiet der Molekularbiologie. Die drei Wissenschaftler erhielten für ihre gemeinsamen Anstrengungen zur Entschlüsselung des genetischen Codes im Jahre 1968 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Khorana hatte ursprünglich mit der chemischen Synthese von DNA begonnen, um die Rolle verschiedener Enzyme zu erforschen. Sein Ziel war es, die Wirkungsweise von Nucleasen und Phosphodiesterasen zu verstehen, doch ohne eine definierte Nucleinsäure künstlich herstellen zu können, gestaltete sich die Arbeit an den Enzymen als schwierig.

In Khoranas Labor wurde die chemische Synthese von Di-, Tri- und Tetranucleotiden etabliert. Statt einzelne Nucleotide miteinander zu verbinden, konzentrierten sich die Mitarbeiter auf die Synthese von Nucleotidgruppen. Auf chemischem Weg Blöcke von DNA zu synthetisieren, war ein grundlegendes Experiment, doch an der Entschlüsselung des genetischen Codes waren auch viele andere Entdeckungen maßgeblich beteiligt.

Matthaei und Nirenberg (1961) entdeckten durch ihre Versuche, dass in einem Gemisch aus Polyuridylat (Poly(U)) und einem bakteriellen, zellfreien System zum Einbau von Aminosäuren Polyphenylalanin entsteht. Dieses Experiment wies darauf hin, dass das Codon UUU die Aminosäure Phenylalanin codiert. In dieser Zeit arbeitete Robert Holley mit tRNA. Er identifizierte die Struktur der tRNA für Alanin, indem er tRNA^{Ala} aus Hefe reinigte, sie mit Nucleasen in Fragmente spaltete und die Einzelteile mit ihren unterschiedlichen Größen und Erkennungsstellen für Enzyme sinnvoll zusammensetzte. Ein anderer wichtiger Fortschritt war die Reinigung der DNA- und RNA-Polymerase.

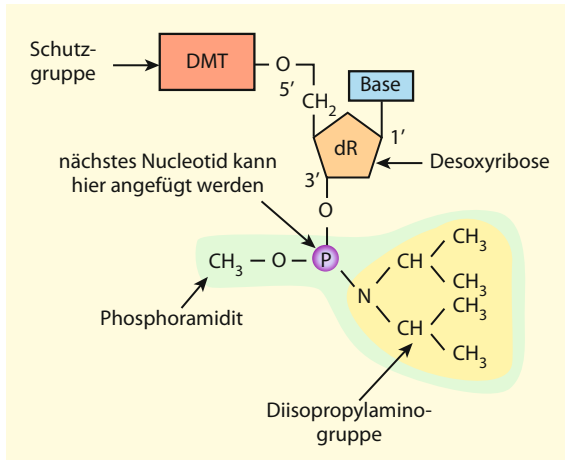
Diese Experimente wurden zu einer eleganten Methode kombiniert, mit deren Hilfe sich die Aminosäure bestimmten ließ, welche durch eine bestimmte Triplet-

nucleotidsequenz codiert wird. Khoranas Gruppe begann zunächst mit der Synthese von doppelsträngigen DNA-Fragmenten aus Di-, Tri- und Tetranucleotiden. Eines dieser Fragmente hatte z.B. die folgende Struktur:



Arthur Kornberg hatte für seine Entdeckung und die Reinigung der DNA-Polymerase I bereits den Nobelpreis erhalten. Khoranas Gruppe mischte ihre kurze, chemisch synthetisierte DNA mit gereinigter DNA-Polymerase, um lange Polydesoxynucleotide mit bekannter Sequenz herzustellen. Als nächstes wurden die DNA-Stücke mit RNA-Polymerase gemischt, um lange Polyribonucleotide mit bekannter Sequenz zu synthetisieren. Diese wurden wiederum mit dem von Matthaei und Nirenberg entworfenen zellfreien System gemischt, sodass Polypeptide entstanden. Das oben gezeigte Dinucleotid führte zu einem Polypeptid aus sich abwechselndem Serin und Leucin. Das Experiment zeigte, dass TCT und CTC Serin bzw. Leucin codieren. Es gab allerdings keine Möglichkeit, genau zu bestimmen, welches Codon welche Aminosäure codiert, sodass weitere Experimente notwendig waren.

Die Verwendung von gereinigten, ¹⁴C-markierten tRNAs leistete letztlich den entscheidenden Beitrag zur Entschlüsselung des Codes. Nirenberg und Leder (1964) mischten Khoranas synthetische Trinucleotide mit markierten tRNAs und Ribosomen (Man beachte, dass die Isolierung von gereinigter tRNA ohne die Arbeit von Robert W. Holley nicht möglich gewesen wäre.) und suchten nach einer Bindung von markierter tRNA an die Trinucleotidsequenz. Diese Experimente gaben Aufschluss über etliche Trinucleotidsequenzen, doch häufig waren die Ergebnisse nicht ganz eindeutig. Es war die Kombination dieser Arbeiten mit Khoranas Erkenntnissen, durch die der genetische Code entschlüsselt werden konnte.

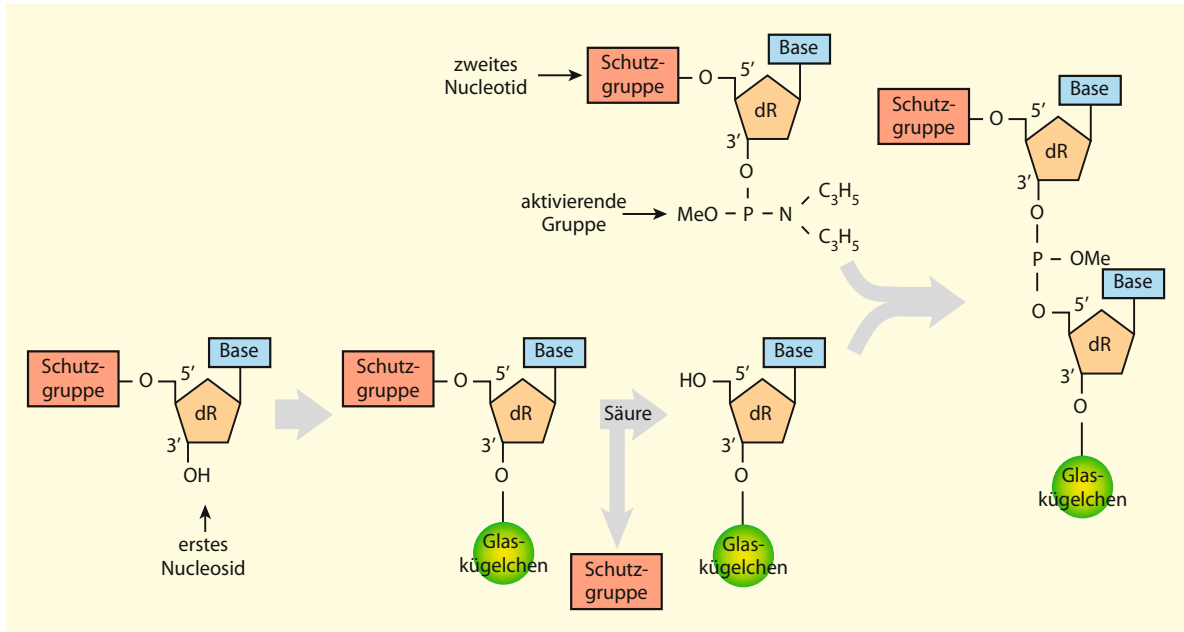


4.12 Für die chemische Synthese von DNA werden Nucleosidphosphoramidite verwendet

Die Nucleotide werden modifiziert, um sicherzustellen, dass die richtige Gruppe mit dem nächsten Reagens reagiert. Jedes Nucleotid trägt zum Schutz seiner 5'-OH-Gruppe eine DMT-Gruppe. Das 3'-OH wird durch eine Phosphoramiditgruppe aktiviert, die wiederum durch Diisopropylamin geschützt ist.

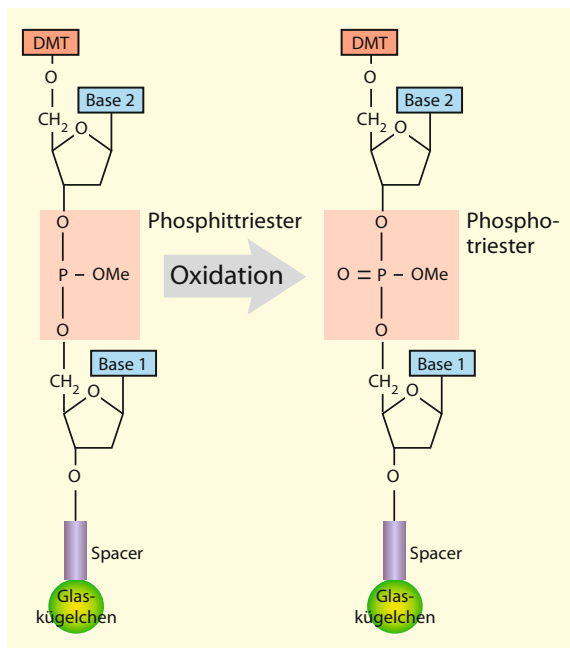
ner Pentose, DMT am 5'-Ende der Pentose, dem Phosphoramidit am 3'-Ende der Pentose und einer Base am 1'-Ende der Pentose besteht (Abb. 4.12). (Ein Problem der frühen Oligonucleotidsynthese-Technologie war die Verzweigung. Das hinzutretende Nucleotid wurde nicht an das freie 5'-Ende gekoppelt, sondern es verband sich gelegentlich mit dem Phosphat zwischen zwei Nucleotiden.) Heutzutage trägt jedes hinzugefügte Nucleotid eine Diisopropylamino-gruppe, welche mit einer methylierten 3'-Phosphitgruppe verbunden ist. Diese Struktur schützt gegen eine unerwünschte Verzweigung. Sie ist außerdem stabil und lässt sich für einen langen Zeitraum lagern. Vor der Zugabe eines weiteren Nucleotids wird die 3'-Phosphitgruppe dieses Nucleotids durch Tetrazol aktiviert. Das Nucleotid wird nun zugegeben und reagiert über seine Phosphitgruppe mit dem fixierten ersten Nucleosid, wodurch ein Dinucleotid entsteht (Abb. 4.13).

Reagiert das letzte Nucleotid der wachsenden Kette nicht mit dem neu zum Reaktionsgemisch gegebenen, muss die wachsende Kette dauerhaft inaktiviert werden, um die Entstehung einer fehlerhaften Sequenz zu verhindern. Das 5'-OH aller Nucleotide, die nicht



4.13 Anfügen des zweiten Nucleotids

Während der chemischen DNA-Synthese werden die Nucleotide in 3'→5'-Richtung aneinandergefügt (in der entgegengesetzten Richtung als bei der DNA-Synthese *in vivo*). Daher muss die 3'-OH-Gruppe des hinzutretenden Nucleotids aktiviert, die 5'-OH-Gruppe des Nucleotids aber blockiert werden (siehe oberes Nucleotid). Bei dem Nucleotid, das bereits mit dem Glaskügelchen verbunden ist, muss die Schutzgruppe vom 5'-OH des Nucleotids durch die Behandlung mit einer schwachen Säure entfernt werden. Tritt das zweite Nucleotid hinzu, reagiert diese Gruppe, und es entsteht ein Dinucleotid.



4.14 Oxidation wandelt einen Phosphittriestern in einen Phosphotriester um

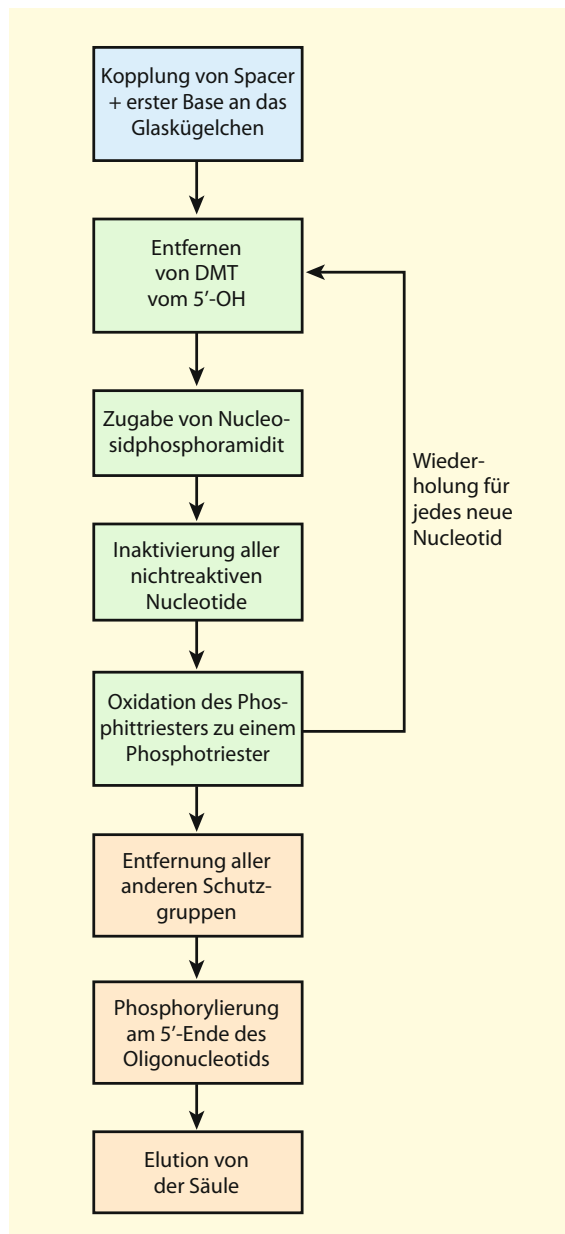
Der Phosphittriestern wird durch Zugabe von Iod zu einem Phosphotriester oxidiert. Dadurch wird das Dinucleotid für weitere Reaktionen stabilisiert.

reagiert haben, wird mit Essigsäureanhydrid und Dimethylaminopyridin acetyliert. Die Verlängerung der Kette ist damit beendet und es können keine weiteren Nucleosidphosphoramidite angefügt werden.

Die Säule besteht nun aus CPG–Spacer–erstes Nucleosid–Phosphit–zweites Nucleosid–DMT. Phosphite werden verwendet, weil sie viel schneller reagieren, doch sie sind nicht stabil. Durch die Zugabe von Iod wird der Phosphittriestern zu einem normalen Phosphotriester oxidiert, der unter sauren Bedingungen viel stabiler ist (Abb. 4.14).

Die Säule kann nun für die Anheftung des dritten Nucleotids vorbereitet werden. Das DMT wird mit TCA entfernt und das dritte Nucleosidphosphoramidit wird zugegeben. Die Ketten werden inaktiviert, sodass alle Dinucleotide, die mit dem dritten Phosphoramidit nicht reagiert haben, vor der Verlängerung mit weiteren Nucleotiden geschützt werden. Schließlich wird der Phosphittriestern zu einem Phosphotriester oxidiert. Dieser Ablauf wiederholt sich, bis alle gewünschten Nucleotide angefügt wurden und das Endprodukt die korrekte Sequenz hat (Abb. 4.15).

Nach Anfügen des letzten Nucleosidphosphoramidits besitzt das Oligonucleotid immer noch die



4.15 Flussdiagramm der Oligonucleotidsynthese

Die Oligonucleotidsynthese besteht aus vielen sich wiederholenden Schritten. Das erste Nucleosid wird über ein Spacermolekül an ein Glaskügelchen gebunden. Als nächstes wird das 5'-DMT entfernt und ein aktiviertes Nucleosidphosphoramidit an das 5'-Ende des ersten Nucleosids gefügt. Alle ersten Nucleoside, die nicht mit dem zweiten Nucleotid reagiert haben, werden dauerhaft inaktiviert, um eine weitere Verlängerung zu verhindern. Als nächstes wird der Phosphittriestern zu einem Phosphotriester oxidiert. Diese Schritte (grün) werden wiederholt, bis das Oligonucleotid die gewünschte Länge erreicht hat. Anschließend durchläuft das Molekül die orange gefärbten Schritte.

DMT-Schutzgruppe am 5'-OH, die Phosphotriester tragen immer noch Methylgruppen und die Aminogruppen der Basen sind geschützt. (Aminogruppen würden während der Synthese mit dem Reagens reagieren, weshalb sie vor der Verknüpfung mit der wachsenden Kette mit chemischen Schutzgruppen versehen werden.) Alle drei Arten von Schutzgruppen müssen entfernt werden, bevor man die Oligonucleotide von der Säule löst. Um die Oligonucleotide biologisch zu aktivieren, ist es auch notwendig, die 5'-OH-Gruppe zu phosphorylieren. In der Regel wird eine Kinase aus dem Bakteriophagen T4 verwendet, um eine Phosphatgruppe vom ATP auf das 5'-Ende des Oligonucleotids zu übertragen. Das neu synthetisierte Oligonucleotid ist nun fertiggestellt.

DNA lässt sich chemisch synthetisieren, indem an ein Nucleosid, das an ein Glaskügelchen gebunden ist, weitere Nucleotide gekoppelt werden. Bei jedem angefügten Nucleotid müssen die Schutzgruppen so modifiziert werden, dass das nächste Nucleotid angehängt werden kann. Der letzte Syntheseschritt ist das Anheften einer Phosphatgruppe an das 5'-Ende.

Chemische Synthese von vollständigen Genen

Wie bereits erwähnt, reagiert bei jeder Addition eines Nucleosids im Rahmen der chemischen Synthese ein Teil der Oligonucleotide nicht mit der nächsten Base, diese Oligonucleotide werden mit einer Acetylgruppe dauerhaft inaktiviert. Die Effizienz der Nucleotidaddition ist bedeutend, denn wäre sie bei jedem Schritt gering, dann würde die Zahl der vollständigen Oligonucleotide exponentiell abnehmen. Läge die Effizienz z.B. in jeder Runde bei 50 % und nur die Hälfte der Oligonucleotide stünde für die Addition der nächsten Base zur Verfügung, dann trüge nur ein Viertel der Oligonucleotide die dritte Base, ein Achtel die vierte Base usw. Selbst wenn das Endprodukt eine Länge von nur 10 Basen hätte, führte die geringe Kopplungseffizienz nur zu einer winzigen Menge von Produkten mit vollständiger Länge. DNA-Syntheseapparate müssen daher in jeder Runde eine Effizienz von etwa 98 % haben, sodass zu kurze Produkte nur einen Bruchteil des Endproduktes ausmachen. Mit einer hohen Effizienz ist es möglich, längere DNA-Abschnitte zu synthetisieren. Beträgt die Effizienz 98 %, dann wäre die

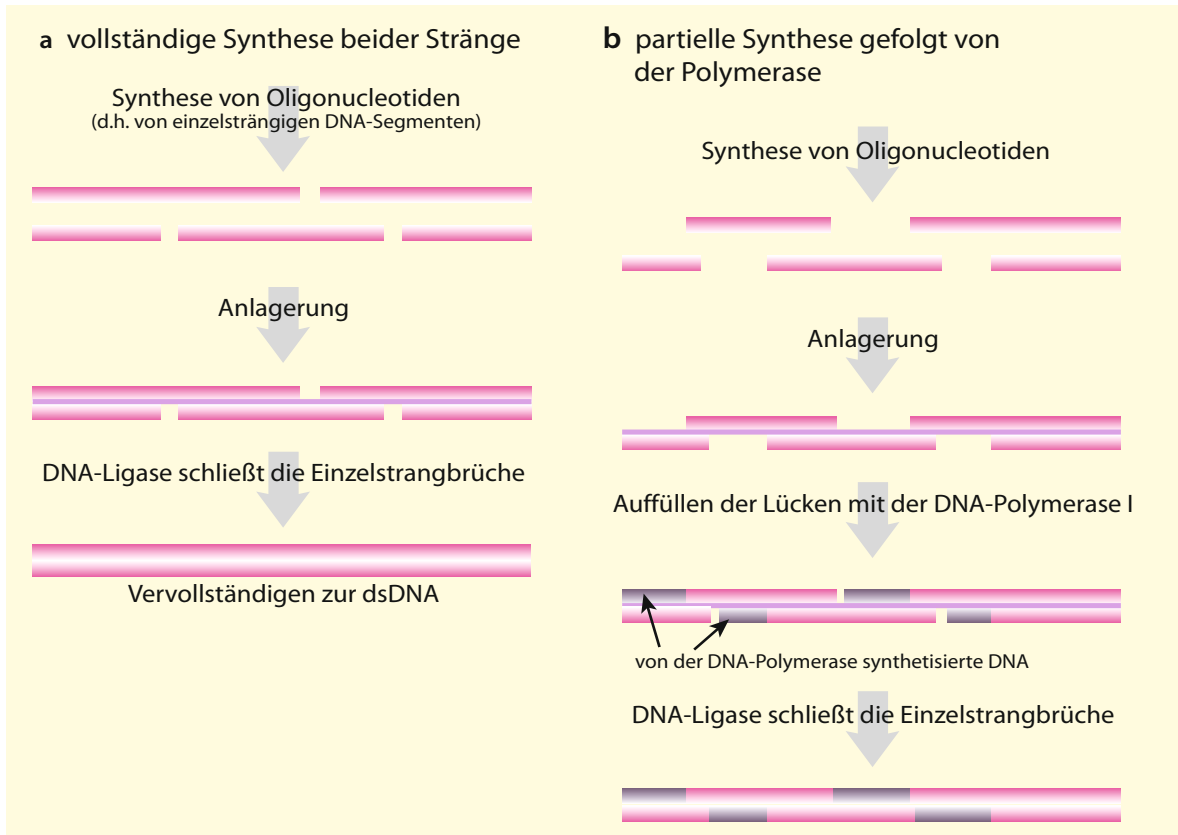
Ausbeute für ein 100 Nucleotide umfassendes Oligonucleotid 10 %. Wird das gewünschte Oligonucleotid von den zu kurzen Produkten durch Elektrophorese getrennt (s. Kap. 3), lassen sich viele vollständige Produkte gewinnen.

Vollständige Gene lassen sich synthetisieren, indem man kürzere Oligonucleotide miteinander verknüpft (Abb. 4.16). Ist die vollständige Sequenz eines Gens bekannt, dann können lange Oligonucleotide synthetisiert werden, die mit der Gensequenz identisch sind. Die Effizienz des DNA-Syntheseapparates begrenzt in der Regel die Länge jedes Segmentes auf etwa 100 Basen; die Gensegmente werden daher mit überlappenden Enden hergestellt. Da Oligonucleotide einzelsträngig sind, werden beide Stränge des Gens synthetisiert, diese lagern sich aneinander, und die Segmente werden durch eine Ligase miteinander verknüpft. Eine weitere Strategie für den Zusammenbau ist die Synthese von nur teilweise überlappenden Einzelsträngen. Die DNA-Polymerase I füllt anschließend die großen einzelsträngigen Lücken auf.

Wenn jede Base mit hoher Effizienz an das wachsende Oligonucleotid gekoppelt wird, lassen sich lange DNA-Abschnitte synthetisieren. Diese Segmente können zu einem vollständigen Gen zusammengesetzt werden.

Durch *in vitro*-DNA-Synthese lässt sich die Basensequenz ermitteln

Eine der Triebkräfte für die Fortschritte in der Biotechnologie ist ohne Zweifel die Möglichkeit, die Sequenz jedes Gens schnell und leicht bestimmen zu können. Bevor die Sequenzierung zu einer Routine-methode wurde, war die Identifizierung eines Gens eine große Herausforderung. Frederick Sanger entwickelte im Jahre 1974 eine Methode zur Sequenzierung eines Gens *in vitro*. Er interessierte sich für die Aminosäuresequenz von Insulin und hatte sich zum Ziel gesetzt, diese Sequenz von der Nucleotidsequenz abzuleiten. Er etablierte die **Kettenabbruchsequenzierung**, die auch heute noch in Grundzügen angewendet wird (Abb. 4.17). Ähnlich wie die DNA-Replikation erfordert die Kettenabbruchsequenzierung einen Primer, die DNA-Polymerase, eine einzelsträngige



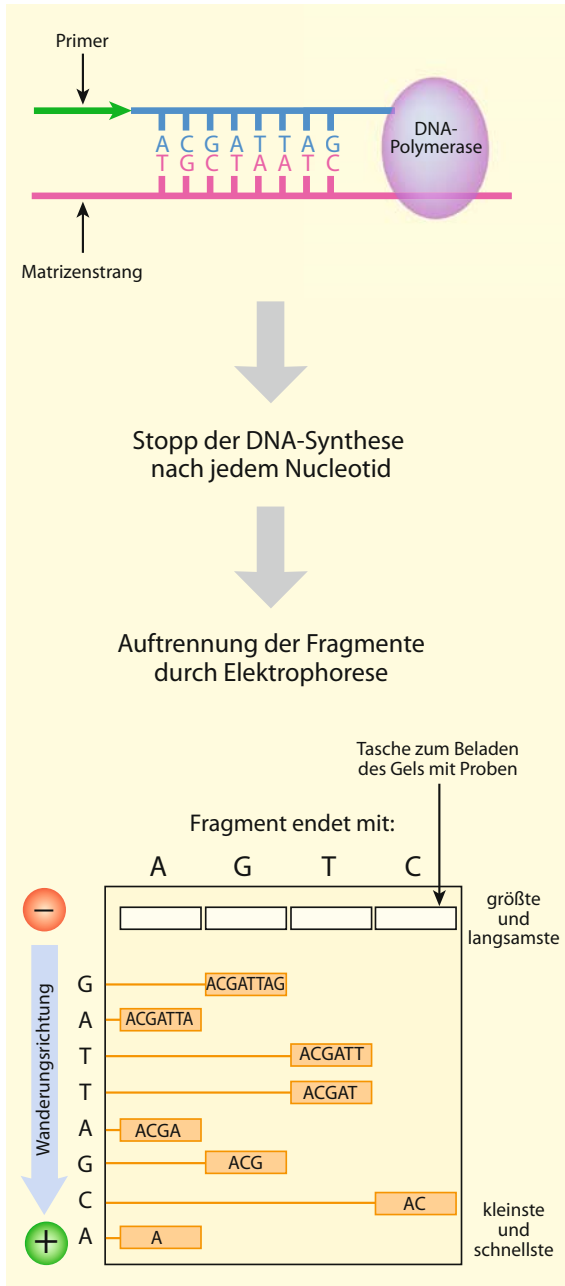
4.16 Synthese und Zusammenbau eines Gens

a Vollständige Synthese beider Stränge. Kleine Gene lassen sich chemisch synthetisieren, indem man überlappende Oligonucleotide herstellt. Die vollständige Sequenz eines Gens, sowohl die des codierenden als auch des nichtcodierenden Stranges, wird ausgehend von kurzen Oligonucleotiden hergestellt. Diese lagern sich aneinander und bilden eine doppelsträngige DNA mit Lücken im Zucker-Phosphat-Rückgrat der Einzelstränge. Die Einzelstrangbrüche werden durch eine DNA-Ligase geschlossen. **b** Partielle Synthese gefolgt von der Polymeraseaktivität. Um längere DNA-Stücke herzustellen werden Oligonucleotide synthetisiert, von denen jeweils nur ein kleiner Bereich der Sequenz mit dem nächsten Oligonucleotid überlappt. Die gesamte Sequenz wird synthetisiert, doch sowohl im codierenden als auch im nichtcodierenden Strang sind Lücken vorhanden. Diese werden mithilfe der DNA-Polymerase I gefüllt, und eine Ligase schließt die verbleibenden Einzelstrangbrüche im Rückgrat.

DNA-Matrize und Desoxynucleotide. Für die *in vitro* ablaufende Sequenzierreaktion werden die Komponenten gemischt, und die DNA-Polymerase stellt viele Kopien der Matrize her. Um die Sequenz ableiten zu können, wird die Verlängerung der DNA-Ketten jedoch an bestimmten Basenpaaren abgebrochen. Die Fragmente werden anschließend durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Ist das letzte Basenpaar jedes Fragments bekannt, lässt sich die Sequenz direkt von dem Gel ablesen (gelesen wird von unten nach oben).

Doch wie weiß man, welches die letzte Base eines Fragments ist? Die DNA-Polymerase synthetisiert einen neuen DNA-Strang anhand der Matrizensequenz.

Die Kette besteht aus Desoxynucleotiden, jedes mit einer Hydroxylgruppe an der 3'-Position des Desoxyriboseringes. Die DNA-Polymerase fügt das nächste Nucleotid an, indem sie dessen 5'-Phosphat mit der 3'-Hydroxylgruppe des vorherigen Nucleotids verknüpft. Fehlt diesem Nucleotid jedoch die 3'-Hydroxylgruppe, dann können keine weiteren Nucleotide angehängt werden und die Kettenverlängerung ist beendet (Abb. 4.18). Daher wird dem Reaktionsansatz für die Sequenzierung neben den Desoxynucleotiden ein gewisser Prozentsatz an Nucleotiden ohne 3'-Hydroxylgruppe zugegeben, die als **Didesoxynucleotide** bezeichnet werden. Ursprünglich wurden diese Di-



4.17 Sequenzieren mithilfe der Kettenabbruchmethode

Bei der Kettenabbruchmethode synthetisiert die DNA-Polymerase ausgehend von einer einzelsträngigen Matrize viele verschiedene DNA-Stränge. Das Enzym bricht nach verschiedenen Nucleotiden ab, sodass Stränge aller möglichen Längen entstehen. Diese werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die kleinsten Fragmente, die sich unten befinden, bestehen aus dem Primer und dem ersten Nucleotid der DNA-Matrize. Längere Fragmente bestehen dagegen aus dem Primer und längeren Nucleotidsträngen, die komplementär zur DNA-Matrize sind.

a zufälliger Stopp an den „G“-Positionen

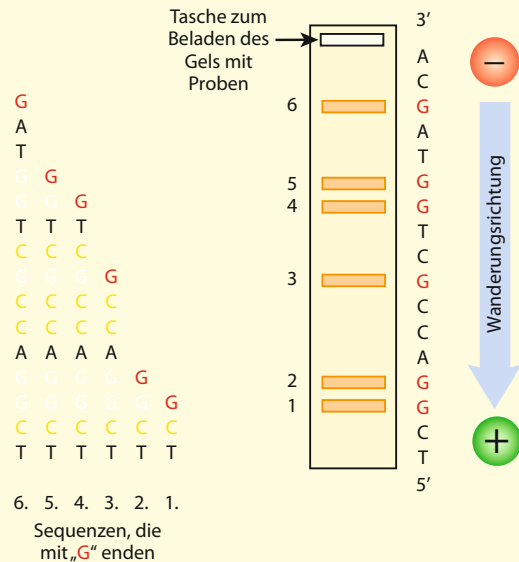
Ursprungssequenz:

T C G G A C C G C T G G T A G C A

Gemisch von Fragmenten, die bei einem G enden, durch die Verwendung von radioaktiv markierten dCTP (C), dATP, dTTP und einem Gemisch aus dGTP () und ddGTP (G).

1. T C G
2. T C G G
3. T C G G A C C G
4. T C G G A C C G C T G
5. T C G G A C C G C T G G
6. T C G G A C C G C T G G T A G

b Auftrennung auf dem Sequenziergel



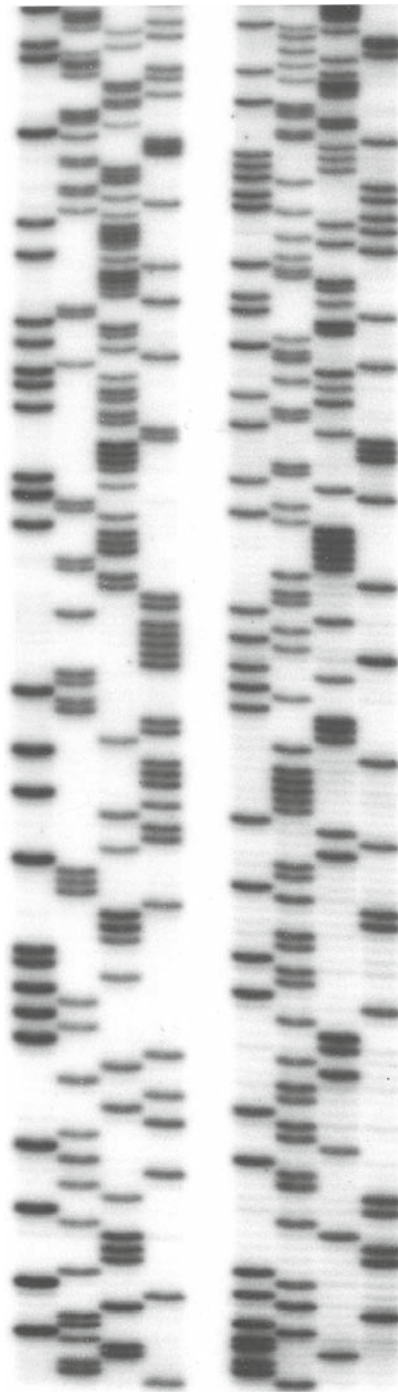
4.18 Kettenabbruch durch Didesoxynucleotide

a Bei der Sequenzierreaktion stellt die DNA-Polymerase viele Kopien der Originalsequenz her. Die Reaktionsgemische für die Sequenzierung enthalten Didesoxynucleotide, die die Verlängerung der DNA-Ketten beenden. Das hier dargestellte Beispiel zeigt die G-Reaktion; das Reaktionsgemisch enthält Triphosphate sowohl von Desoxyguanosin (dG) als auch von Didesoxyguanosin (ddG). Wird ddG eingebaut (rot), dann verursacht dies einen Kettenabbruch. Wird dG (blau) eingebaut, dann wird die Kette weiter verlängert. (Es ist zu beachten, dass das normale dCTP radioaktiv markiert ist, sodass jeder Strang durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden kann.) **b** Trennt man den Reaktionsansatz mit dem ddG nach der Reaktion über ein Polyacrylamidgel auf, dann werden die Fragmente nach ihrer Größe getrennt. Jede Bande auf dem Autoradiogramm entspricht einem G in der Originalsequenz.

desoxynucleotide mit ^{32}P -Phosphat markiert, das sich dann am Ende eines Stranges befand. Für die Verstärkung des Signals wird nun eines der vier normalen Desoxynucleotide radioaktiv markiert. Die radioaktive Markierung der Fragmente lässt sich über Autoradiographie des Sequenziergels nachweisen (s. Kap. 3). Um das letzte Nucleotid zu identifizieren, werden mit jeder Matrize vier verschiedene Reaktionen durchgeführt, jede mit einem anderen der vier möglichen Didesoxynucleotide. So enthält Reaktion 1 z.B. alle normalen Desoxynucleotide und einen gewissen Anteil Didesoxyguanosin; alle Fragmente, die in diesem Gemisch entstehen, enden an einer Stelle, an der Guanosin in der Sequenz vorkommt. Reaktionsansatz 2 ist ähnlich zusammengesetzt, enthält jedoch Didesoxycytidin als Abbruchnucleotid, wodurch alle entstehenden Fragmente mit einem Cytidin enden. Jede Reaktion läuft an der gleichen DNA-Matrize ab und mit gleichem Primer, sodass jedes Segment an derselben Stelle beginnt. Nur die Stellen des Abbruchs unterscheiden sich. Solche Reaktionen führen in der Regel zu Fragmenten mit einer Länge von maximal 300 Nucleotiden.

Die Fragmente sind für DNA relativ kurz und variieren in ihrer Länge nur um ein Nucleotid; daher müssen sie mithilfe einer Polyacrylamidgelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden (s. Kap. 3). Das Prinzip ist das gleiche, wie bei der Agarosegelelektrophorese. Polyacrylamid besitzt allerdings kleinere Poren, sodass sich kleinere Fragmente mit einer höheren Auflösung trennen lassen. Jede Reaktion wird in einer anderen Spur aufgetragen, die Spuren liegen jedoch unmittelbar nebeneinander. Eine Autoradiographie macht die Fragmente im Gel sichtbar. Wird das Sequenziergel getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt, dann zeigt der Film nach der Entwicklung dunkle Banden, die jeweils ein terminiertes Fragment darstellen. Die Sequenz lässt sich nun von unten nach oben lesen. Die Fragmente, deren Synthese bereits unmittelbar hinter dem Primer beendet war, sind die kürzesten, sie haben sich schneller durch das Gel bewegt als die, deren Synthese weiter vom Primer entfernt beendet war. Die Banden erscheinen als eine Art Leiter, bei der jede Sprosse durch ein anderes Nucleotid repräsentiert wird (Abb. 4.19).

Die Art der Matrize hat einen Einfluss darauf, ob die Reaktion eine lesbare Sequenz ergibt oder nicht. Eine einzelsträngige DNA-Matrize liefert die besten Ergebnisse. Sie lässt sich durch Klonierung der DNA in den Bakteriophagen M13 gewinnen, der eine einzelsträngige DNA besitzt. Infiziert das rekombinante Virus seinen Wirt *E. coli*, entstehen durch *rolling circle*-Replikation und Verpackung der DNA Tausende



4.19 Autoradiogramm eines Sequenziergels

Dargestellt ist die Sequenzierung von zwei verschiedenen DNA-Matrizen. Die beiden Sequenzen bestehen jeweils aus vier Spuren, jede Spur repräsentiert eine der vier Basen. Die Sequenz wird von unten nach oben gelesen. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kiswar Alam, Labor des Autors.)

von einzelsträngigen Kopien der DNA-Matrize, die sich für die Sequenzierung einsetzen lassen. Eine weitere Möglichkeit ist die Klonierung der Zielsequenz in einen typischen Plasmidvektor (s. Kap. 3). Die doppelsträngige DNA-Matrize wird entweder durch Hitze oder Chemikalien denaturiert.

Um die *in vitro*-Sequenzierung zu verbessern, wurde die native DNA-Polymerase modifiziert. Die native DNA-Polymerase I besitzt eine Domäne, die fehlgepaarte oder fehlerhafte Basen ausschneidet und ersetzt. Durch diese Aktivität würden Didesoxynucleotide eher entfernt als eingebaut. Die entsprechende Domäne lässt sich leicht durch einen Proteaseverdau aus der gereinigten DNA-Polymerase ausschneiden, ohne die anderen Aktivitäten des Enzyms zu beeinträchtigen, es entsteht eine sogenannte Klenow-Polymerase. Das Enzym wurde durch weitere Modifikationen den Erfordernissen der Sequenzierung noch stärker angepasst. Die gentechnische Veränderung verbesserte die Prozessivität – die Polymerase fällt seltener von der Matrize ab, dadurch ist die Synthese längerer Stränge möglich.

Die Reihenfolge der Nucleotide in einem DNA-Strang lässt sich durch *in vitro*-Replikation ermitteln.

Didesoxynucleotide sind der Schlüssel zur Bestimmung der Sequenz. Werden diese Nucleotide bei einer *in vitro*-Replikation eingebaut, kann die DNA-Polymerase keine weiteren Nucleotide hinzufügen und die Synthesereaktion bricht ab. Ist nur eine Form von Didesoxynucleotiden im Reaktionsgemisch vorhanden, unterscheiden sich die entstehenden Fragmente dennoch in ihrer Länge. Jede Fragmentlänge entspricht der Position des Didesoxynucleotids relativ zum Primer.

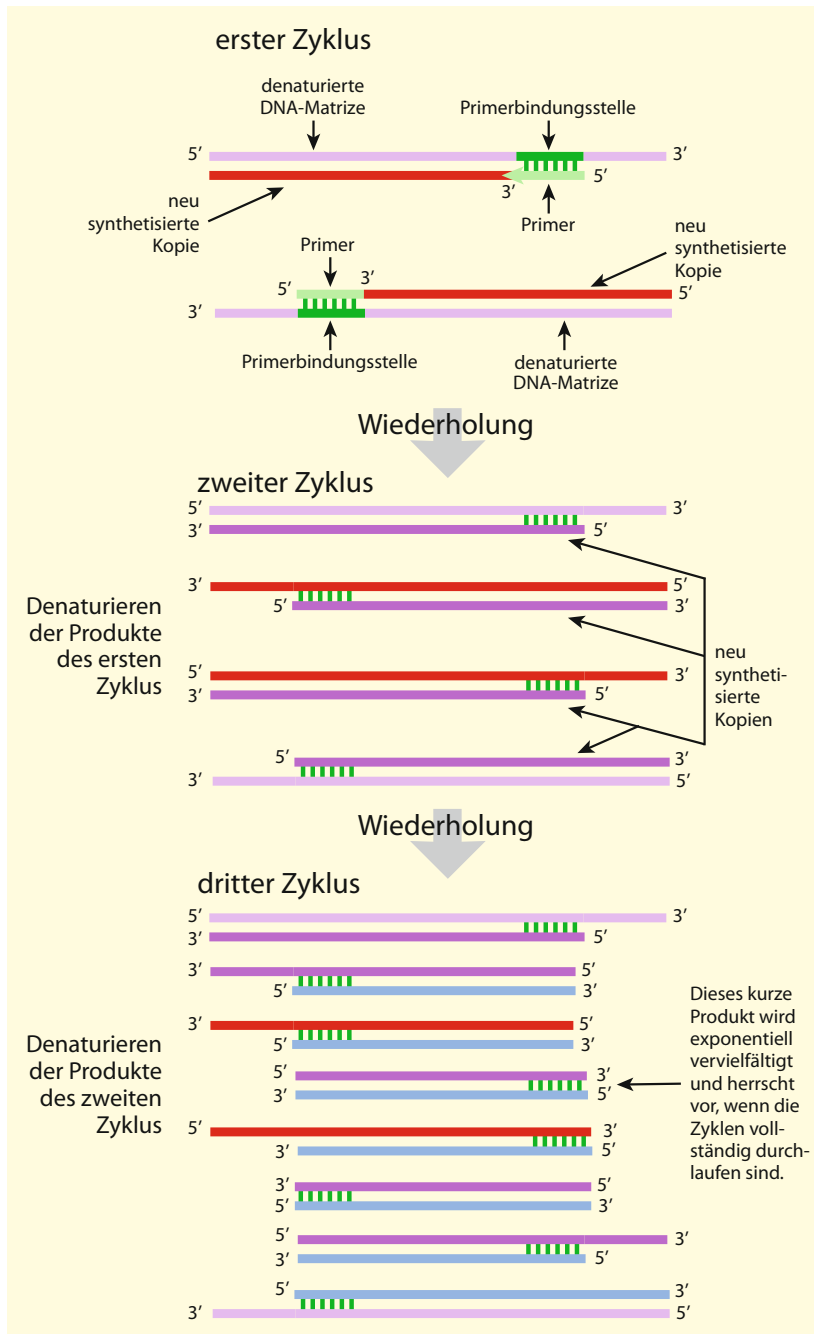
Die Polymerasekettenreaktion nutzt die *in vitro*-Synthese, um geringe DNA-Mengen zu vermehren

Die **Polymerasekettenreaktion (PCR)** vervielfältigt geringe Mengen an DNA und stellt viele Kopien der DNA-Sequenz her. Dieser Methode liegen die Prinzipien der DNA-Replikation zugrunde, d.h. die DNA wird immer wieder von der DNA-Polymerase repliziert, bis eine große Menge an Fragmenten hergestellt

ist. Kary Mullis erfand diese Technik 1987 während seiner Tätigkeit bei dem Biotechnologieunternehmen Cetus. Er erhielt daraufhin den Nobelpreis für Chemie, da die PCR auf die Biologie und die Wissenschaft im Allgemeinen einen enormen Einfluss hatte. Das Verfahren wird in der Forensik eingesetzt, um Opfer oder Kriminelle zu identifizieren. Geringe DNA-Mengen, die am Tatort zurückbleiben, lassen sich so vermehren (s. Kap. 24); ebenso ist es möglich, mithilfe der PCR infektiöse Krankheiten wie AIDS nachzuweisen, noch bevor sich Symptome entwickeln (s. Kap. 22); durch PCR lassen sich spezifische Gensegmente vervielfältigen, ohne die Segmente zuerst klonieren zu müssen; PCR wird heute in allen Bereichen der Biowissenschaften eingesetzt.

Für die Durchführung einer PCR sind, wie bei einem Kopierer, der Papier, Tinte und einen Kopiermechanismus benötigt, spezifische Reagenzien notwendig. Die zu vervielfältigende Probe wird als DNA-Matrize (engl. *template*) bezeichnet und ist häufig eine bekannte Sequenz eines Gens. Die Matrize ist doppelsträngig und für die Reaktion reichen extrem kleine Mengen aus. PCR vermag ein bestimmtes Gensegment direkt aus einem *Caenorhabditis elegans*-Individuum oder einer einzigen Zelle zu vermehren. Das zweite essenzielle Reagens ist ein Primerpaar mit Sequenzen, die komplementär sind zu den Enden der DNA-Matrize. Bei den DNA-Primern handelt es sich um Oligonucleotide mit einer Länge von etwa acht bis 20 Nucleotiden. Ein Primer lagert sich an das 5'-Ende des Sense-Stranges, der andere an das 3'-Ende des Antisense-Stranges der Zielsequenz. Weil die Primer spezifisch sind, kann die Matrize auch gemischt mit anderen DNA-Sequenzen vorliegen, die Reaktion wird dennoch spezifisch ablaufen. Das dritte Reagens ist eine Mischung aus Nucleosidtriphosphaten und das vierte ist die **Taq-DNA-Polymerase** aus *Thermus aquaticus*, die die einzelnen Kopien synthetisiert.

Der grundlegende Mechanismus der PCR besteht aus der Hitzedenaturierung der Matrize, der Anlagerung der Primer und der Herstellung der komplementären Kopie durch die DNA-Polymerase – allesamt Schritte der DNA-Replikation. Diese drei Schritte werden mehrfach wiederholt, bis von einer Matrize Millionen identischer Kopien synthetisiert wurden. Eine sehr geringe Menge an DNA wird auf diese Weise exponentiell kopiert, sodass sie in einen Vektor kloniert oder auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden kann (s. Kap. 3). Der Prozess erfordert einen zyklischen Temperaturwechsel. Dieser wird durch eine Apparatur bewerkstelligt, die als **Thermocycler** bezeichnet wird und deren Heizblock die Temperatur



4.20 Die ersten drei Zyklen der PCR

Im ersten Zyklus wird die doppelsträngige DNA-Matrize (hellviolett) denaturiert, komplementäre Primer lagern sich an die Primerbindungsstellen und die *Taq*-Polymerase synthetisiert eine Kopie der Matrize (rot). In der zweiten Runde werden die beiden doppelsträngigen Produkte des ersten Zyklus denaturiert und es entstehen vier einzelsträngige Matrizen. Die gleichen Primer lagern sich an die vier Matrizenstränge und die *Taq*-Polymerase synthetisiert vier doppelsträngige Moleküle (dunkelviolett). Im dritten Zyklus werden die vier doppelsträngigen Produkte des zweiten Zyklus denaturiert, die Primer lagern sich an, und aus den vier Produkten des zweiten Zyklus werden acht. In jedem nachfolgenden Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung verdoppelt sich die Zahl der Kopien, wodurch eine geringe Menge an DNA-Matrize zu einer großen Menge an PCR-Produkt vermehrt wird.

extrem schnell verändern kann. Ein Zyklus ist innerhalb von Minuten beendet. Die Temperatur ändert sich von 94 °C (Denaturierung der Matrize) auf 50–60 °C (Anlagerung der Primer; die Temperatur ist abhängig von Länge und Sequenz der Primer) und schließlich auf ca. 70 °C (Synthese der neuen DNA durch die *Taq*-Polymerase). Vor der Entwicklung des

Thermocyclers wurde der Reaktionsansatz für die entsprechenden Zeiträume in unterschiedlich temperierten Wasserbädern inkubiert – ein sehr mühsames und nicht sehr genaues Unterfangen.

In Grundzügen erinnert die PCR an die DNA-Replikation, jedoch mit ein paar Modifikationen (Abb. 4.20). Wie bei anderen Reaktionen einer *in vi*

tro-DNA-Synthese wird die doppelsträngige Matrize durch hohe Temperaturen denaturiert, statt mithilfe von Enzymen. Dann wird die Temperatur gesenkt, sodass sich die Primer an ihre Bindungsstellen anlagern können. Die Primer sind so beschaffen, dass sie an gegenüberliegende Stellen auf den Strängen binden, einer am Anfang eines Gens, der andere am Ende. Dann verlängert die DNA-Polymerase beide Primer und wandelt die beiden einzelsträngigen Matrizen in doppelsträngige DNA um. (Anmerkung: Bei der Sequenzierung wird nur ein Primer verwendet und nur ein Matrizenstrang repliziert, bei der PCR sind es jedoch beide Stränge.) Für die Synthese wird am häufigsten die *Taq*-Polymerase eingesetzt, weil sie sehr hitzestabil ist und bei den hohen Temperaturen nicht denaturiert, die für die Denaturierung der DNA notwendig sind. Die *Taq*-Polymerase stammt aus *Thermus aquaticus*, einem Bakterium, das in hydrothermalen Tiefseequellen vorkommt. Nach der ersten Replikationsrunde wird der Prozess wiederholt. Die beiden DNA-Stränge werden denaturiert, die Temperatur gesenkt und die Primer lagern sich an ihre Zielsequenzen an. Die *Taq*-Polymerase synthetisiert die nächsten vier Stränge und in dieser Runde werden vier doppelsträngige Kopien der Zielsequenz gebildet. Zu Beginn des Prozesses entstehen längere Stränge, deren Zahl jedoch nur linear ansteigt; nur der von den beiden Primern flankierte Abschnitt wird exponentiell vervielfältigt, sodass die Matrize und die langen Stränge mit der Zeit nur noch einen kleinen Teil des Produkts ausmachen.

Die Primer sind der Schlüssel für die PCR. Lagern sich die Primer nicht an die vorgesehenen Stellen, ist der Abstand zwischen ihnen zu groß oder bilden sie Sekundärstrukturen aus, statt sich an die Zielsequenz zu lagern, ist es für die *Taq*-Polymerase unmöglich, den Abschnitt genau zu amplifizieren. Die Reaktion wird auch nicht korrekt ablaufen, wenn beide Primer an denselben Strang binden. Ist die Sequenz der Matrize bekannt, kann man Primer synthetisieren, die an Sequenzen binden, welche stromaufwärts bzw. stromabwärts einer zu vervielfältigenden Region liegen. Das Verfahren lässt sich allerdings so verändern, dass auch unbekannte Sequenzen mittels PCR analysiert werden können (s. unten).

Bei der PCR wird mithilfe der DNA-Polymerase eine doppelsträngige Matrize repliziert, sodass zwei Kopien entstehen. Wird jedes der Produkte wieder repliziert, entstehen in der zweiten Runde schon vier Kopien usw. Die Zahl der Kopien nimmt also exponentiell zu.

Die automatisierte Zyklussequenzierung verknüpft PCR und Sequenzierung

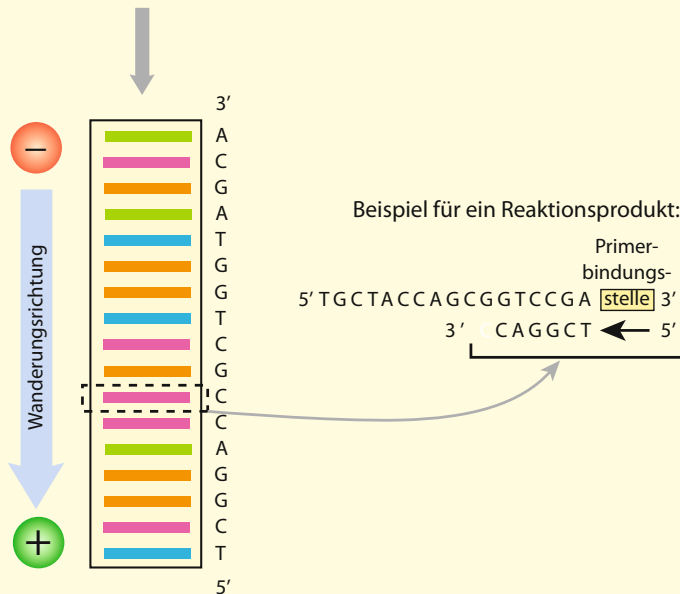
Die automatisierte DNA-Sequenzierung nutzt eine PCR-ähnliche Reaktion. Die Methode stellt gegenüber der herkömmlichen eine Verbesserung dar, weil sie schnell ist und die Auswertung von einem Computer durchgeführt werden kann, statt von einem Menschen. Bei der PCR-Sequenzierung, oder der **Zyklussequenzierung**, wird eine DNA-Matrize mit einer unbekannten Sequenz durch die *Taq*-Polymerase und nicht durch die Klenow-Polymerase vervielfältigt. Wie bei der DNA-Polymerase I wurde auch bei der *Taq*-Polymerase die Korrekturlesefunktion entfernt. Die Reaktionsansätze für die Zyklussequenzierung enthalten alle vier Desoxynucleotide, alle vier Didesoxynucleotide, einen Primer, die DNA-Matrize und die *Taq*-Polymerase. Im Gegensatz zu dem herkömmlichen Sequenzierverfahren ist jedes der vier Didesoxynucleotide mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert; alle Didesoxynucleotide können sich daher in demselben Ansatz befinden.

Die Proben werden in einem Thermocycler vervielfältigt. Zunächst wird die Matrize durch hohe Temperaturen denaturiert, dann die Temperatur gesenkt und die Primer lagern sich an. Schließlich wird die Temperatur auf die für die *Taq*-Polymerase optimalen ca. 70 °C angehoben, damit das Enzym die DNA-Kopien synthetisieren kann. Während der Polymerisierung werden die Didesoxynucleotide eingebaut und verursachen genau wie bei der herkömmlichen Sequenzierung Kettenabbrüche. Damit die Fragmente im Durchschnitt bei jedem G, A, T oder C abbrechen, muss das Verhältnis der Konzentrationen von Didesoxynucleotiden zu Desoxynucleotiden genau eingestellt werden. Nachdem die *Taq*-Polymerase Tausende von Kopien hergestellt hat, deren Synthese jeweils an einem anderen Nucleotid abgebrochen wurde, wird das gesamte Gemisch in einer Spur eines Sequenziergels aufgetrennt (Abb. 4.21). Nach der Auftrennung sind Banden unterschiedlicher Farben zu erkennen, von denen jede einem der fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotide und daher einer bestimmten Base entspricht.

Die Zyklussequenzierung hat gegenüber der herkömmlichen Sequenzierung einige Vorteile. Bei der herkömmlichen Methode sind die Temperaturen geringer; daher bildet die DNA mit größerer Wahrscheinlichkeit Sekundärstrukturen. Dieses gilt insbe-

Mischen der folgenden Komponenten für die PCR-Reaktion:

1. DNA-Matrize (5' TGCTACCAGCGGTCCGA 3')
2. Primer
3. *Taq*-Polymerase
4. Desoxynucleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
5. Didesoxynucleotide (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)



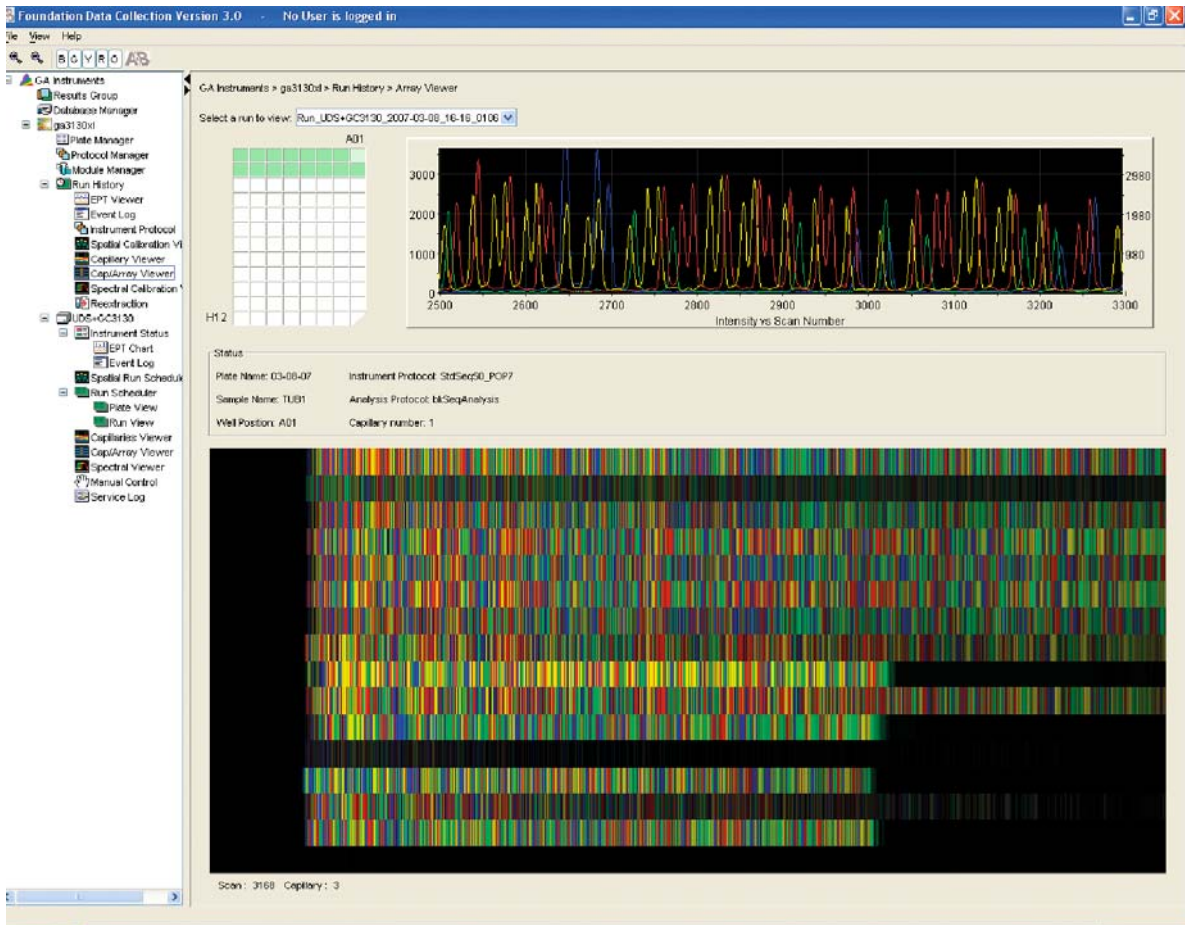
4.21 Zyklussequenzierung

Bei der Zyklussequenzierung enthält der Reaktionsansatz eine DNA-Matrize, Primer, *Taq*-Polymerase, Desoxynucleotide und Didesoxynucleotide. Jedes der vier Didesoxynucleotide ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Der Sequenzierautomat erkennt die Farbe und generiert die Sequenzdaten.

sondere für doppelsträngige DNA-Matrizen, deren Einzelstränge sich wieder zu einem Doppelstrang zusammenlagern können, noch bevor die Klenow-Polymerase mit der Synthese begonnen hat. Bei der Zyklussequenzierung erreicht die Temperatur in jeder Runde 95 °C, wodurch Sekundärstrukturen oder doppelsträngige Bereiche gelöst werden. Ein weiterer Vorteil der Zyklussequenzierung ist die mögliche Kontrolle über die Hybridisierung der Primer. Einige Primer funktionieren in dem herkömmlichen Verfahren nicht korrekt, weil sie an sehr ähnliche Sequenzen binden. Bei der Zyklussequenzierung wird die Temperatur für die Anlagerung der Primer streng kontrolliert und lässt sich so hoch wählen, dass unspezifische Bindungen meist ausgeschlossen sind. Und schließlich ist für die Zyklussequenzierung weniger DNA-Matrize notwendig; die Sequenzierung kann daher mit weniger Ausgangsmaterial durchgeführt werden.

Ein weiterer Fortschritt betrifft das Nachweissystem. Ursprünglich verwendeten die Wissenschaftler radioaktiv markierte Nucleotide und die Banden mussten durch eine Autoradiographie sichtbar ge-

macht werden. Eine der wichtigsten Verbesserungen war die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden, sodass das letzte Nucleotid jedes DNA-Stranges fluoresziert. Für jedes Nucleotid kann ein anderer Farbstoff verwendet werden, wodurch die ganze Reaktion wiederum in einem Reaktionsgefäß ablaufen kann. **DNA-Sequenziergeräte** detektieren jeden der Fluoreszenzfarbstoffe und zeichnen die Basensequenz auf (Abb. 4.22). Ähnlich wie bei der herkömmlichen Sequenzierung wird das Gemisch aus den unterschiedlich langen Fragmenten auf ein Gel aufgetragen, doch statt vier Spuren zu beanspruchen, ist es bei diesem Verfahren nur noch eine. Einige Sequenziergeräte lesen bis zu 96 Proben nebeneinander auf einem Gel. Im unteren Bereich jeder Spur befindet sich ein Fluoreszenzaktivator, der Licht emittiert, um die Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen. Auf der anderen Seite befindet sich ein Detektor, der die Wellenlängen erkennt, die die unterschiedlichen Farbstoffe emittieren. Jedes Fragment wandert am Detektor vorbei, dieser bestimmt die emittierte Wellenlänge, wandelt das Signal um und überträgt die Daten in eine Grafik, in der das Signal als Peak dargestellt ist. Für jeden



4.22 Daten einer automatisierten DNA-Sequenzierung

Rohe Fluoreszenzdaten aus einem Sequenziergerät (Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer), die von einer CCD-Kamera für 16 verschiedene Proben aufgenommen und gespeichert wurden. Oben sind die Fluoreszenz-Peaks für die einzelnen Basen einer Probe dargestellt. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Brewster F. Kingham, Sequencing & Genotyping Center, University of Delaware.

Farbstoff wird ein Peak eingetragen und der entsprechenden Base zugewiesen. Ein Computer speichert die Daten und generiert die DNA-Sequenz.

Die Zyklussequenzierung verbindet die PCR- mit der Sequenzierertechnologie. Jede PCR-Reaktion verläuft gleich, bis auf die genau eingestellte Menge an zugegebenen, fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden. Die *Taq*-Polymerase stoppt mit der Synthese, sobald ein Didesoxynucleotid eingebaut wurde. Durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes und Detektion der Fluoreszenz bestimmt das Sequenziergerät die Base am Ende jedes Fragmentes.

Modifikationen der PCR-Technologie

Seit Kary Mullis das PCR-Verfahren etablierte, wurden viele verschiedene Abwandlungen der Methode entwickelt. Alle beruhen auf derselben grundlegenden PCR-Reaktion, bei der eine geringe Menge an DNA durch *in vitro*-Replikation vervielfältigt wird. Viele dieser Protokolle sind wichtige Werkzeuge für die Forschung an rekombinanter DNA.

Viele Strategien ermöglichen die Amplifikation eines DNA-Abschnittes durch PCR, selbst wenn dessen Sequenz unbekannt ist. So lässt sich eine un-

verwandte Proteinsequenz: His-Gln-Val

His-Codons: CAT, CAC
 Gln-Codons: CAA, CAG
 Val-Codons: GTT, GTG, GTC, GTA

mögliche DNA-Sequenzen:

CATCAAGTT	CACCAAGTT
CATCAAGTG	CACCAAGTG
CATCAAGTC	CACCAAGTC
CATCAAGTA	CACCAAGTA
CATCAGGTT	CACCAGGTT
CATCAGGTG	CACCAGGTG
CATCAGGTC	CACCAGGTC
CATCAGGTA	CACCAGGTA

4.23 Degenerierte DNA-Primer

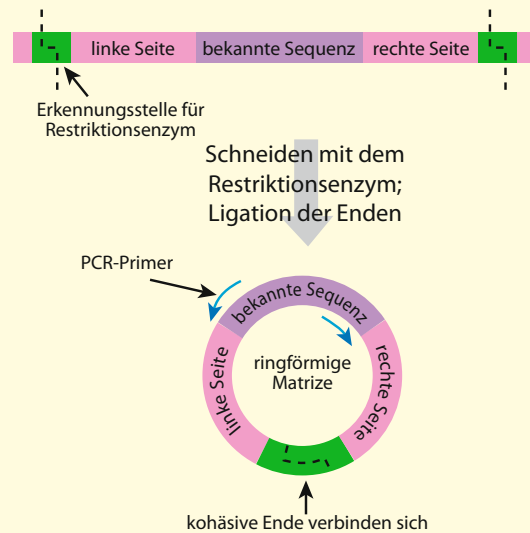
Eine Proteinsequenz aus drei Aminosäuren kann durch viele verschiedene DNA-Sequenzen codiert werden. Degenerierte Primer sind ein Gemisch aus all diesen möglichen Sequenzen. Zur unbekannten DNA-Sequenz für His-Gln-Val wird mindestens eine Primersequenz passen, die DNA wird anschließend durch PCR vervielfältigt.

bekannte Sequenz z.B. in einen Vektor klonieren (dessen Sequenz bekannt ist). Die Primer werden so gewählt, dass sie sich an Bereiche des Vektors kurz vor und hinter der klonierten Fremd-DNA lagern.

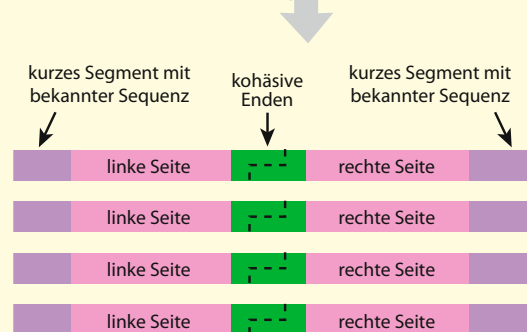
Eine andere Möglichkeit ist, die Sequenz eines codierten Proteins zu nutzen, um die PCR-Primer abzuleiten. Es sei daran erinnert, dass die meisten Aminosäuren durch mehr als ein Codon verschlüsselt werden. Während der Translation eines Gens werden daher ein oder mehrere Codons für die gleiche Aminosäure verwendet. Eine Proteinsequenz lässt sich also nicht mit eindeutigem Ergebnis zurück in eine Nucleotidsequenz umwandeln. Es gibt z.B. zwei verschiedene Codons für Histidin und Glutamin und vier Codons für Serin; für die Nucleotidsequenz, die die Aminosäuresequenz Histidin-Glutamin-Valin codiert, existieren daher 16 unterschiedliche Kombinationen (Abb. 4.23).

Werden Primer entworfen, die auf einer Aminosäuresequenz beruhen, dann handelt es sich meist um sogenannte **degenerierte Primer**, einem Gemisch aus zwei oder drei unterschiedlichen Basen an der Wobbleposition des Triplettcodons. Einige Oligonucleotidketten werden nach diesem Schritt das eine Nucleotid tragen, andere dagegen ein anderes. Werden viele unterschiedliche Wobblebasen zugegeben, entsteht eine Primerpopulation, von der jeder Primer eine etwas andere Sequenz besitzt. Von dieser Popu-

Schritt 1: Herstellung der Matrize



Schritt 2: Durchführung der PCR



4.24 Inverse PCR

Durch inverse PCR ist es möglich, eine unbekannte Sequenz durch PCR zu vervielfältigen. Voraussetzung ist allerdings, dass sie sich in der Nähe einer bekannten Sequenz befindet. Die DNA wird mit einem Restriktionsenzym geschnitten, das stromauf- und stromabwärts der bekannten Region aber nicht innerhalb dieser Region schneidet. Das lineare Produkt wird nun zu einem Ring geschlossen und anschließend mithilfe von Primern amplifiziert, die an die bekannte Sequenz binden. Die PCR-Produkte enthalten die links und rechts der bekannten Sequenz gelegene unbekannte Sequenz und lassen sich klonieren und sequenzieren.

lation binden schließlich einige Primer perfekt an die Ziel-DNA, einige lagern sich mit wenigen Fehlpaarungen an, und andere werden gar nicht binden. Die Temperatur für die Primeranlagerung wird so gewählt, dass ein paar Fehlpaarungen möglich sind.

Eine **inverse PCR** wird eingesetzt, wenn nur von einer Seite der Zielregion die Sequenz bekannt ist (Abb. 4.24). Zunächst wählt man ein Restriktionsenzym, das innerhalb der bekannten Sequenz nicht schneidet. Die Erkennungssequenz sollte sechs oder mehr Basenpaare lang sein, um relativ lange DNA-Abschnitte für die PCR-Amplifikation zu erhalten. Die Ziel-DNA wird mit diesem Enzym geschnitten und es entsteht ein DNA-Abschnitt mit kohäsiven Enden, eines stromaufwärts der bekannten Sequenz und das andere stromabwärts. Die Enden werden zu einem DNA-Ring ligiert. Die PCR-Primer werden so gewählt, dass sie an die Enden der bekannten Sequenz binden. Jeder Primer bindet an einen der DNA-Stränge der ringförmigen DNA, doch weisen ihre 3'-OH-Enden nach „außen“ in Richtung der unbekannten Sequenz. Diese wird nun in einer PCR vervielfältigt und es entstehen lineare Moleküle mit kurzen Bereichen der bekannten Sequenz an den Enden und der Restriktionsschnittstelle in der Mitte.

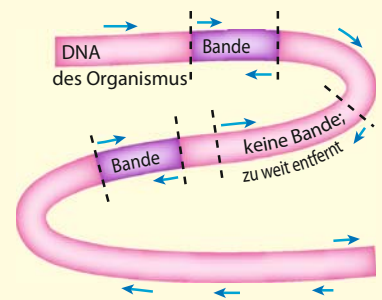
Degenerierte Primer werden auf Grundlage der Aminosäuresequenz entworfen und enthalten an der Wobbleposition verschiedene Nucleotide.

Mithilfe der inversen PCR wird DNA vervielfältigt, die sich in der Nähe einer bekannten Sequenz befindet. Dazu sucht man zunächst eine Restriktionsschnittstelle in dem unbekannten Bereich, schneidet diese Region aus und vervielfältigt das gesamte Stück mithilfe der *Taq*-Polymerase.

Zufällig vervielfältigte polymorphe DNA

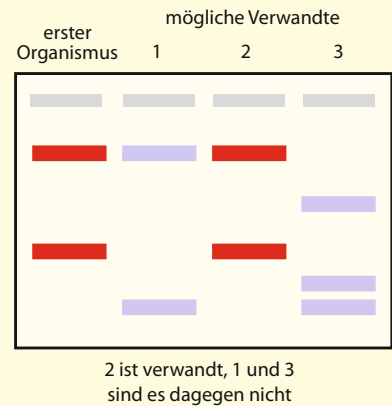
Eine weitere Anwendung der PCR, bezeichnet als **zufällig vervielfältigte polymorphe DNA** (engl. *randomly amplified polymorphic DNA*, **RAPD**; sprich „rapid“), erlaubt den Forschern, die genetische Verwandtschaft von zwei DNA-Proben zu überprüfen (Abb. 4.25). Zunächst wird aus zwei verschiedenen Organismen DNA isoliert. Es gibt daher zwei Proben mit Ziel-DNA, die unter Verwendung des gleichen Primersatzes miteinander verglichen werden. Wie zuvor ist auch hier die Sequenz nicht bekannt, doch statt degenerierte Primer zu verwenden, konstruiert man bei diesem Verfahren Primer mit zufälliger Sequenz. Die Länge der Primer bestimmt, wie häufig die Moleküle an die Ziel-DNA binden. Besteht ein Primer

Primer-
bindungs-
stellen für
RAPDs



PCR und Auftrennen der
Produkte auf einem Agarosegel

Agarosegel
mit RAPDs
verschie-
dener Orga-
nismen



4.25 Zufällig vervielfältigte polymorphe DNA

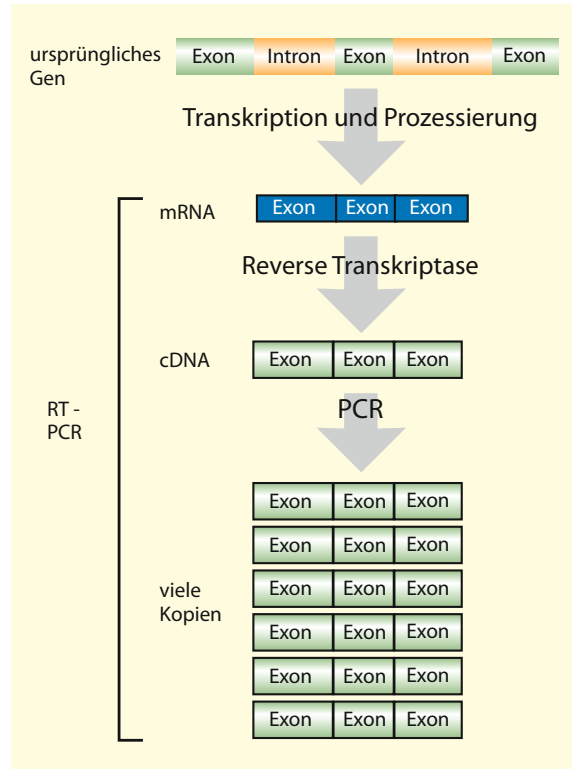
Der erste Schritt der RAPD-Analyse ist die Entwicklung von Primern, die an zufälligen Stellen, die weder zu selten noch zu häufig sein dürfen, in der genomischen DNA binden. In diesem Beispiel sind die Primer ausreichend lang, um sich an 12 Stellen an die genomische DNA zu lagern. Damit die PCR erfolgreich ist, müssen je zwei Primer so an die gegenüberliegenden Stränge binden, dass ihre 3'-Enden aufeinander zu weisen. Außerdem müssen diese Primerbindungsstellen ausreichend nahe beieinander liegen, damit ein PCR-Produkt entstehen kann. In diesem Beispiel sind es drei Primerpaare, doch nur zwei von ihnen liegen so eng zusammen, dass ein Fragment synthetisiert wird. Dieses Primerdesign führt somit zu zwei PCR-Produkten, die in der ersten Spur des Gels (bezeichnet mit „erster Organismus“) zu sehen sind. Die gleichen Primer werden für die Vervielfältigung der genomischen DNA anderer Organismen verwendet, von denen man vermutet, dass sie miteinander verwandt sind. In diesem Beispiel zeigt der mögliche Verwandte 2 das gleiche Bandenmuster wie der erste Organismus und ist vermutlich mit diesem verwandt. Die beiden anderen Organismen stimmen dagegen nicht überein, eine Verwandtschaft ist daher auszuschließen.

z.B. aus fünf Basen, dann wird er im Durchschnitt alle 4^5 Basen = $4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 = 1024$ Basen binden. Stammt die Ziel-DNA-Probe aus einem großen Genom, dann wird ein solcher Primer viel zu oft binden. In der Praxis haben sich bislang Primer mit einer Länge von etwa zehn Basen bewährt. Die zufälligen Primer werden mit Nucleotiden, *Taq*-Polymerase und jeweils einer Ziel-DNA gemischt, wie bei einer normalen PCR. Um Fragmente der Ziel-DNA zu vervielfältigen, müssen zwei Primer so an die gegenüberliegenden DNA-Stränge binden, dass ihre 3'-Enden aufeinander zu weisen und zwischen ihnen nur wenige Tausend Basenpaare liegen. Die Produkte der beiden PCR-Reaktionen werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Bandenmuster miteinander verglichen. Die Zahl und die Größe der Produkte wird in beiden Proben unterschiedlich sein. Sind die beiden Organismen jedoch eng verwandt, dann werden sich die DNA-Sequenzen und somit auch die Bandenmuster stark ähneln und nur ein oder zwei unterschiedliche Fragmente aufweisen. Weichen die Bandenmuster dagegen stark voneinander ab, dann sind die beiden Organismen nicht verwandt. Ein Vergleich der RAPDs von zwei Organismen gibt daher Aufschluss über den Verwandtschaftsgrad.

Zwei nahe verwandte Organismen haben ähnliche DNA-Sequenzen. Werden die gleichen Primer für die Vervielfältigung von Genomabschnitten verwendet, sind sich die Bandenmuster, die während der Gelelektrophorese entstehen, sehr ähnlich.

Reverse-Transkriptase-PCR

Bei der **Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)** wird das Enzym Reverse Transkriptase eingesetzt, um aus der mRNA eines Organismus eine cDNA-Kopie herzustellen, die anschließend in einer PCR als Matrice dient und vervielfältigt wird (Abb. 4.26). Wenn mithilfe der PCR aus eukaryotischer DNA ein Gen amplifiziert werden soll, liegt der Vorteil dieser Methode auf der Hand. Eukaryoten besitzen Introns, die die codierenden Bereiche unterbrechen und von denen einige extrem lang sind. Nach der Transkription wird das mRNA-Primärtranskript prozessiert und alle Introns werden entfernt, sodass mRNA entsteht. Verwendet man diese mRNA als Ausgangsmaterial für PCR, dann überlässt man es also der Zelle, aus



4.26 Reverse-Transkriptase-PCR

RT-PCR ist ein zweistufiges Verfahren, bei dem zunächst von der mRNA eine cDNA-Kopie hergestellt wird, die man anschließend in der PCR als Matrice einsetzt.

der Zielsequenz die Introns zu beseitigen. In der Praxis ist die RT-PCR ein zweistufiger Prozess. Zunächst erkennt die Reverse Transkriptase die 3'-Enden der Primer mit den sich wiederholenden Thyminresten und synthetisiert einen DNA-Strang, der zur mRNA komplementär ist. (Die Thyminreste gehen Basenpaarungen mit dem Poly(A)-Schwanz der mRNA ein.) Danach wird der RNA-Strang durch einen weiteren DNA-Strang ersetzt, und es entsteht doppelsträngige DNA (d.h. cDNA). Als nächstes wird die cDNA mit den entsprechenden Primern (von denen einer in der Regel an den Poly(A)-Schwanz bindet), der *Taq*-Polymerase und Nucleotiden in einer herkömmlichen PCR vervielfältigt.

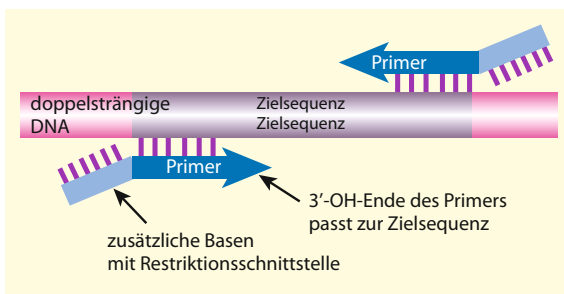
Bei der RT-PCR wandelt die Reverse Transkriptase mRNA in doppelsträngige cDNA um. Anschließend wird das Gen ohne Introns durch herkömmliche PCR vervielfältigt.

PCR in der Gentechnik

Durch PCR ist es möglich, Gene oder Gensegmente zu klonieren, um sie zu identifizieren und zu untersuchen. Die PCR erlaubt es dem Wissenschaftler aber auch, ein bereits bekanntes Gen zu manipulieren. Verschiedene Abwandlungen der PCR-Methode ermöglichen die Kopplung von zwei Genen oder Gensegmenten zu einem, die Deletion oder Inversion von DNA-Bereichen und die Veränderung von einzelnen Nucleotiden. Das Gen und das von ihm codierte Protein können so subtil manipuliert werden.

PCR kann die Klonierung eines unbekannten DNA-Abschnittes vereinfachen. Spezielle PCR-Primer schaffen neue Restriktionsschnittstellen an den Enden der Zielsequenz (Abb. 4.27). Der Primer wird so konstruiert, dass sein 5'-Ende die gewünschte Schnittstelle enthält und sein 3'-Ende komplementär zur Ziel-DNA ist. Das 5'-Ende des Primers bindet nicht an die Ziel-DNA, doch solange das 3'-Ende ausreichend gut zur Zielsequenz passt, wird die Bindung des Primers nicht beeinflusst. Die *Taq*-Polymerase beginnt am 3'-Ende mit der Synthese; das Enzym wird daher durch Fehlpaarungen der 5'-Sequenzen nicht beeinträchtigt. Das entstehende PCR-Produkt lässt sich mit dem entsprechenden Restriktionsenzym schneiden und in einen geeigneten Vektor klonieren.

Anders als bei der Addition von Restriktionsschnittstellen an die Enden der PCR-Produkte lassen

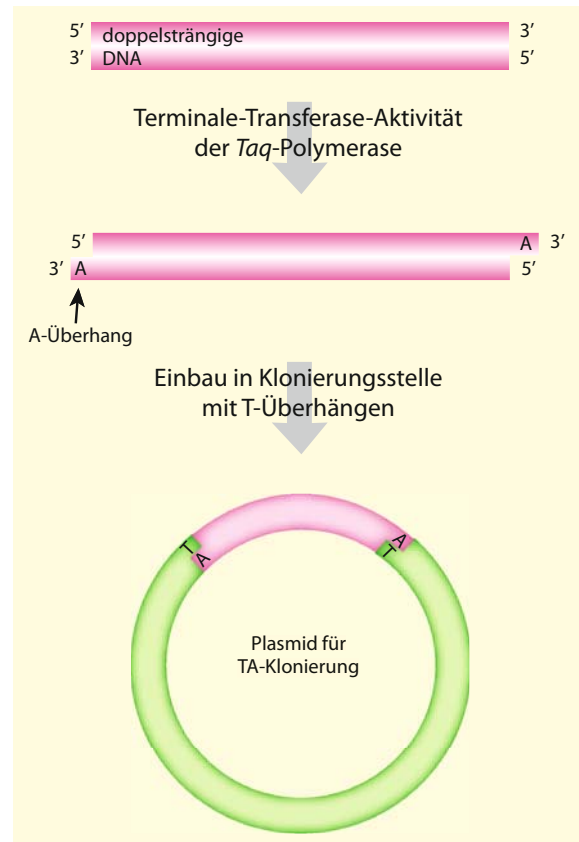


4.27 Einbau von künstlichen Restriktionsschnittstellen

PCR-Primer lassen sich so konstruieren, dass sie an ihren 5'-Enden nichthomologe Bereiche besitzen, die die Erkennungssequenz für ein bestimmtes Restriktionsenzym enthalten. Nach der PCR trägt das vervielfältigte Produkt diese Erkennungsstellen an beiden Enden. Wird das Produkt nun mit dem Restriktionsenzym gespalten, dann entstehen kohäsive Enden, die zu denen des gewählten Vektors passen.

sich durch **TA-Klonierung** PCR-Produkte direkt klonieren (Abb. 4.28). Die *Taq*-Polymerase verfügt über eine Terminale-Transferase-Aktivität, durch die an den Enden der von ihr synthetisierten PCR-Produkte einzelne Adeninüberhänge entstehen. Es wurden spezielle Vektoren entwickelt, die einzelne Thyminüberhänge enthalten. Mischt man nun PCR-Produkt und TA-Klonierungsvektor mit einer DNA-Ligase, wird das Produkt ohne weitere Veränderungen in den Vektor ligiert.

Die PCR lässt sich auch einsetzen, um klonierte Gene zu manipulieren. Zwei verschiedene Gensegmente lassen sich durch Anwendung der **overlap-PCR** („Überlappungs-PCR“) zu einem Mo-



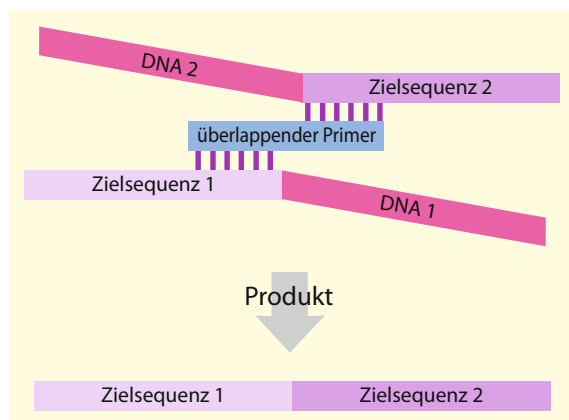
4.28 TA-Klonierung von PCR-Produkten

Wenn die *Taq*-Polymerase während der PCR ein Stück DNA vervielfältigt, fügt die Terminale-Transferase-Aktivität ein zusätzliches Adenin an die 3'-Enden an. Der TA-Klonierungsvektor wurde so konstruiert, dass er in linearisierter Form einen 5'-Thyminüberhang besitzt. Das PCR-Produkt lässt sich nun in diesen Vektor klonieren, ohne dass spezifische Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt werden müssen.

lekül verbinden (Abb. 4.29). In diesem Fall wird die PCR mit drei Primern durchgeführt: einer ist komplementär zum Anfang des ersten Gensegmentes, einer ist komplementär zum Ende des zweiten Gensegmentes und der dritte ist zur einen Hälfte komplementär zum Ende von Gensegment 1 und zur anderen Hälfte zum Anfang von Gensegment 2. Bei der PCR fusionieren die beiden Gensegmente durch einen wenig anschaulichen Mechanismus, doch wahrscheinlich bildet eines der ersten PCR-Produkte eine Schleife aus.

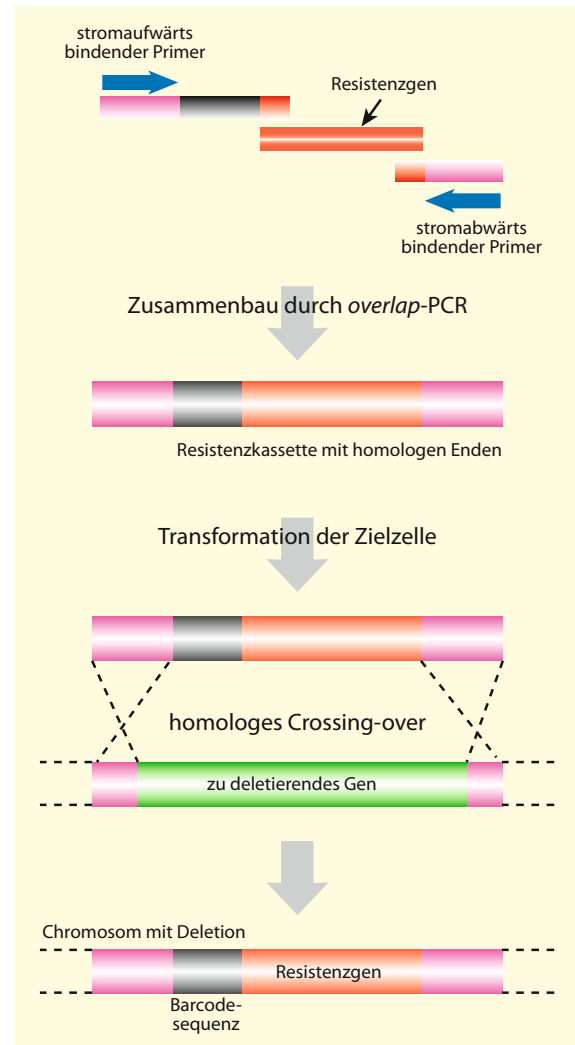
PCR lässt sich außerdem nutzen, um große Abschnitte eines Gens zu deletieren bzw. um sie in ein Gen einzufügen (Abb. 4.30). Wieder einmal ist das Design der Primer der Schlüssel für den Erfolg. So bestehen z.B. Primer für Insertionen aus zwei Bereichen: die erste Hälfte ist homolog zu der Sequenz um die Insertionsstelle; die zweite Hälfte enthält Sequenzen, die komplementär sind zu der einzufügenden Sequenz. Nehmen wir z.B. an, ein Gen für Antibiotikaresistenz wie *npt* (vermittelt Neomycinresistenz) soll in einen Klonierungsvektor eingefügt werden. Die 5'-Enden der Primer sind komplementär zu den Sequenzen beiderseits der Insertionsstelle auf dem Vektor und ihre 3'-Enden sind komplementär zu den Enden des *npt*-Gens. Zunächst wird das *npt*-Gen mit den Primern vervielfältigt, wodurch das Produkt an den Enden mit Sequenzen ausgestattet wird, die ho-

molog zu Sequenzen auf dem Vektor sind. Als nächstes werden Bakterien, die den entsprechenden Vektor enthalten, mit dem PCR-Produkt transformiert. Das *npt*-Gen rekombiniert mit der Insertionsstelle auf dem Vektor über homologe Rekombination, wodurch das *npt*-Gen in den Vektor eingefügt wird.



4.29 Overlap-PCR

Überlappende Primer lassen sich verwenden, um zwei verschiedene Gensegmente miteinander zu verbinden. In diesem Schema trägt der überlappende Primer an einem Ende Sequenzen, die komplementär sind zur Zielsequenz 1, und der andere solche, die komplementär sind zur Zielsequenz 2. Die PCR führt zu einem Produkt, bei dem diese beiden Bereiche miteinander verbunden sind.



4.30 Insertionen und Deletionen durch PCR

Im ersten Schritt wird durch PCR eine spezifische Kasette konstruiert. Diese enthält sowohl ein geeignetes Markergen als auch stromauf- und stromabwärts liegende Sequenzen, die zur Zielstelle homolog sind. Eine Wirtszelle wird mit dieser Kasette transformiert und es findet ein homologes Crossing-over statt. Die Rekombinanten werden mithilfe der Antibiotikaresistenz selektiert, die von der Kasette vermittelt wird. Die Barcode-Sequenz ist ein singulärer Marker, der für die Identifizierung der Kasette verwendet wird.

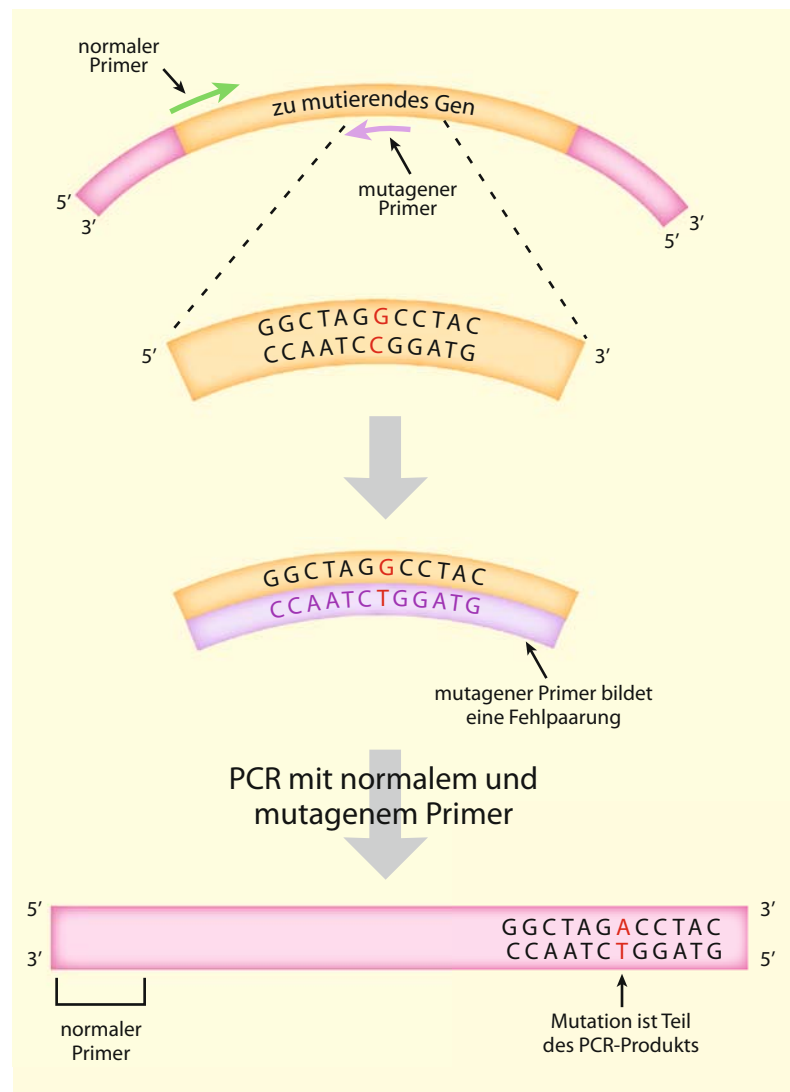
Die Insertionsstelle(n) bestimmen, ob die Antibiotikakassette nur eingebaut wird oder ob die Insertion mit einer Deletion einhergeht. Erkennen die beiden PCR-Primer verschiedene Stellen für die homologe Rekombination, dann rekombiniert das eingeschleuste PCR-Fragment an beiden Stellen. Die homologe Rekombination führt so zu einem Einbau des *npt*-Gens, durch den ein Teil des Vektors ersetzt wird, und nicht nur zu einem Einbau an einer bestimmten Stelle im Vektor.

Mithilfe der PCR lassen sich durch **gezielte Mutagenese** (engl. *directed mutagenesis*) auch einzelne Nucleotide in einer Sequenz austauschen (Abb. 4.31).

In der Regel werden nur eines oder ein paar benachbarte Nucleotide ausgetauscht. Zunächst wird ein entsprechend veränderter mutagener Primer hergestellt, der in seinem mittleren Bereich die ausgetauschten Nucleotide enthält. Der Primer lagert sich an die Zielsequenz, wobei die Fehlpaarungen jedoch toleriert werden; es müssen auf beiden Seiten der Fehlpaarungen ausreichend viele Nucleotide perfekt binden, sodass die Bindung für die PCR stabil genug ist. Der zweite Primer bei dieser Reaktion ist ein normaler Primer. Während der PCR wird dann die Ziel-DNA vervielfältigt, wobei die Sequenz am Ende durch den mutagenen Primer verändert wird. Diese

4.31 Gezielte Mutagenese mithilfe von PCR

Das zu mutierende Gen wird kloniert und die vollständige Sequenz ist bekannt. Um ein spezifisches Nucleotid zu verändern, werden in einer PCR ein normaler und ein mutagener Primer miteinander kombiniert. Beim mutagenen Primer ist ein Nucleotid im mittleren Bereich ausgetauscht, sodass es an dieser Stelle zu einer Fehlpaarung kommt, wenn der Primer sich anlagert. Die übrigen Nucleotide sind jedoch komplementär. Das PCR-Produkt trägt die Sequenz des mutagenen Primers.



Änderungen können relativ gering ausfallen, doch wenn die richtigen Nucleotide modifiziert werden, dann wird auch eine wichtige Aminosäure ausgetauscht und die Funktion eines Proteins kann sich ändern. Ein solcher Ansatz wird häufig verwendet, um die Bedeutung einzelner Aminosäuren in einem Protein zu ermitteln.

Mithilfe der Primer lassen sich in PCR-Produkte Restriktionsschnittstellen einfügen oder die Produkte tragen durch die Aktivität der *Taq*-Polymerase zusätzliche Adeninreste an ihren Enden. Dadurch ist es möglich, die PCR-Produkte in einen Vektor zu klonieren.

Durch PCR lassen sich Deletionen oder Insertionen einführen oder auch verschiedene Fragmente miteinander verbinden.

Mithilfe der PCR lassen sich durch gezielte Mutagenese Nucleotidsequenzen verändern.

► Weiterführende Literatur

- Agarwal KL, Büchi H, Caruthers MH, Gupta N, Khorana HG, Kleppe K, Kumar A, Ohtsuka E, Rajbhandary UL, Van De Sande JH, Sgaramella V, Weber H, Yamada T (1970) Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature* 227: 27–34
- Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Kresge N, Simoni RD, Hill RL (2005) Arthur Kornberg's discovery of DNA Polymerase I. *J Biol Chem* 280: 46
- Matthaei JH, Nirenberg MW (1961) Characteristics and stabilization of DNase-sensitive protein synthesis in *E. coli* extracts. *Proc Natl Acad Sci USA* 47: 1580–1588
- Mülhardt C (2008) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 6. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Nirenberg MW, Leder P (1964) RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145: 1399

RNA-Technologien

Einführung

Antisense-RNA verändert die mRNA-Expression

Antisense-Sequenzen kontrollieren eine Vielzahl biologischer Phänomene

Antisense-Oligonucleotide

Antisense-Oligonucleotide können das Spleißen beeinflussen

Probleme bei der Verwendung von Antisense-Oligonucleotiden

Die Expression von Antisense-RNA-Konstrukten

Die gezielte Verabreichung von Antisense-Therapeutika

RNA-Interferenz nutzt Antisense-Sequenzen, um die Genexpression zu hemmen

RNAi in Pflanzen und Pilzen

MikroRNAs sind Antisense-Sequenzen, die die Genexpression verändern

Anwendungen von RNAi bei der Analyse der Genexpression

RNAi für die Untersuchung von Säugergen

Funktionelles Screening mit RNAi-Bibliotheken

Ribozyme katalysieren Spaltungs- und Ligationsreaktionen

Kleine, natürlich vorkommende Ribozyme

Die gentechnische Veränderung von Ribozymen für medizinische und biotechnologische Anwendungen

RNA-SELEX identifiziert neue Bindungspartner von Ribozymen

In vitro-Evolution und *in vitro*-Selektion von Ribozymen

Synthetische Ribozyme in der Medizin

Allosterische Desoxyribozyme katalysieren spezifische Reaktionen

Riboschalter werden durch Effektormoleküle reguliert

Die gentechnische Veränderung allosterischer Riboschalter und Ribozyme

Weiterführende Literatur

Einführung

RNA hat in der Biologie vielerlei Funktionen, die sich für viele biotechnologische Anwendungen nutzen lassen. Die am besten verstandene Rolle der RNA ist die der Messenger-RNA. Über viele Jahre hinweg nahm man an, dass RNA ein Zwischenprodukt mit einer wichtigen, aber dennoch beschränkten Funktion ist. Heutzutage weiß man, dass ein wichtiger Teil der Genregulation auf RNA-Ebene stattfindet. Statt einfach die Genexpression zu regulieren, synthetisieren Organismen RNAs, die die Translation der mRNA in ein Protein kontrollieren. In einigen Organismen stellt **Antisense-RNA** eine Möglichkeit dar, die Translation zu regulieren. Diese Entdeckung eröffnet neue Möglichkeiten der Nutzung von Antisense-RNA, um die Synthese von Proteinen, die Krankheiten verursachen, zu inhibieren oder zu verzögern. Eine zweite Methode der RNA-regulierten Genexpression ist die **RNA-Interferenz (RNAi)**. In diesem Fall erkennen kleine, nichtcodierende RNAs spezifische mRNAs und lösen deren Abbau aus. Diese zufällige Entdeckung ebnete den Weg für ein Verfahren, mit dem sich die Proteintranslation spezifisch kontrollieren lässt. Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz im Jahr 1993, haben sich die Anwendungsmöglichkeiten außerordentlich erweitert. Die dritte neue Funktion von RNA ist, dass einige RNA-Sequenzen selbst enzymatische Reaktionen katalysieren können. **Ribozyme**, wie diese RNAs heißen, kommen in vielen Organismen vor und katalysieren die Spaltung und Ligation unterschiedlicher Substrate. Dieses Kapitel konzentriert sich auf die Bedeutung von Antisense-RNA, RNA-Interferenz und Ribozymen für Biologie und Biotechnologie.

Antisense-RNA verändert die mRNA-Expression

Der Begriff „Antisense“ bezieht sich auf die Orientierung der komplementären Stränge während der Transkription. Die beiden komplementären DNA-Stränge werden als Sense (= codierend oder plus) und Antisense (= nichtcodierend oder minus; s. Kap. 2) bezeichnet. Für die Transkription wird der Antisense-Strang als Matrize verwendet, sodass die mRNA-Sequenz identisch ist mit der Sequenz des Sense-Stranges (bis auf die Anwesenheit von Thymin

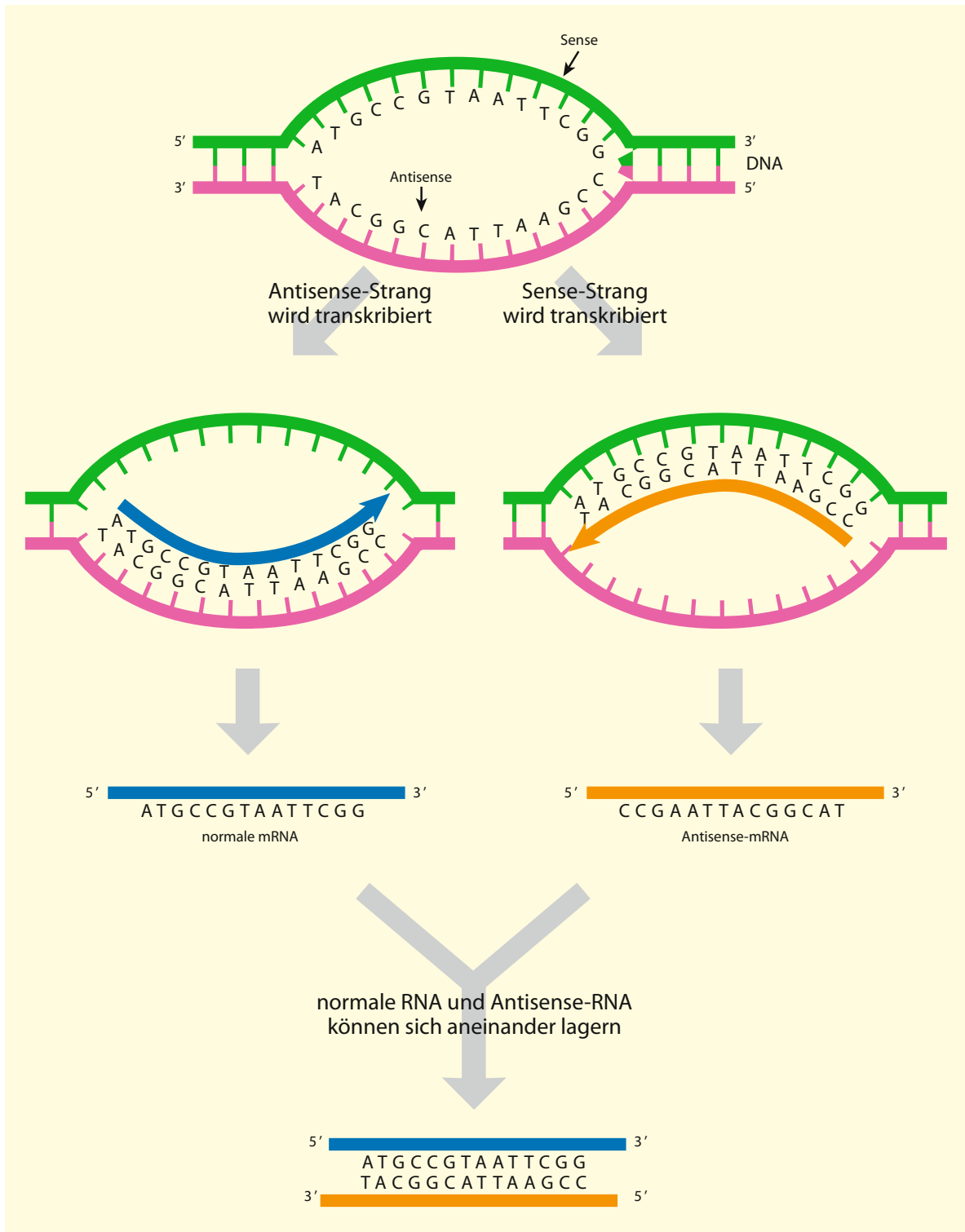
anstelle von Uracil). Antisense-RNA wird mit dem Sense-Strang als Matrize synthetisiert; ihre Sequenz ist daher komplementär zur mRNA (Abb. 5.1).

Antisense-RNA wird in normalen Zellen vieler Organismen, einschließlich des Menschen, synthetisiert. Außerdem wird Antisense-mRNA künstlich hergestellt, um die Genexpression unter Laborbedingungen beeinflussen zu können. Enthält eine Zelle sowohl mRNA (d.h. den Sense-Strang der RNA) als auch die komplementäre Antisense-Kopie, dann lagern sich die beiden Stränge zu einer doppelsträngigen RNA zusammen. Diese kann entweder die Translation inhibieren, indem sie die Ribosomenbindungsstelle blockiert, oder das Spleißen der mRNA wird durch die Blockierung der Spleißstelle unterbunden (Abb. 5.2a). Werden Antisense-Sequenzen im Labor synthetisiert, dann handelt es sich wegen der größeren Stabilität in der Regel um DNA (s. Abb. 5.2b). RNase H ist ein zelluläres Enzym, das normalerweise während der Replikation aktiv ist. Es erkennt und spaltet das Rückgrat der RNA in einem DNA-RNA-Doppelstrang (Heteroduplex) und markiert so den Doppelstrang aus Antisense-DNA und mRNA für den weiteren Abbau. RNase H erkennt eine 7 bp lange Heteroduplex, sodass der homologe Bereich zwischen Antisense-DNA und mRNA nicht sehr lang sein muss, um diesen Prozess auszulösen.

Antisense-RNA-Sequenzen sind komplementär zur Ziel-mRNA. Antisense-RNA bildet mit der Zielsequenz doppelsträngige Bereiche, die die Proteinsynthese oder das Spleißen der mRNA blockieren.

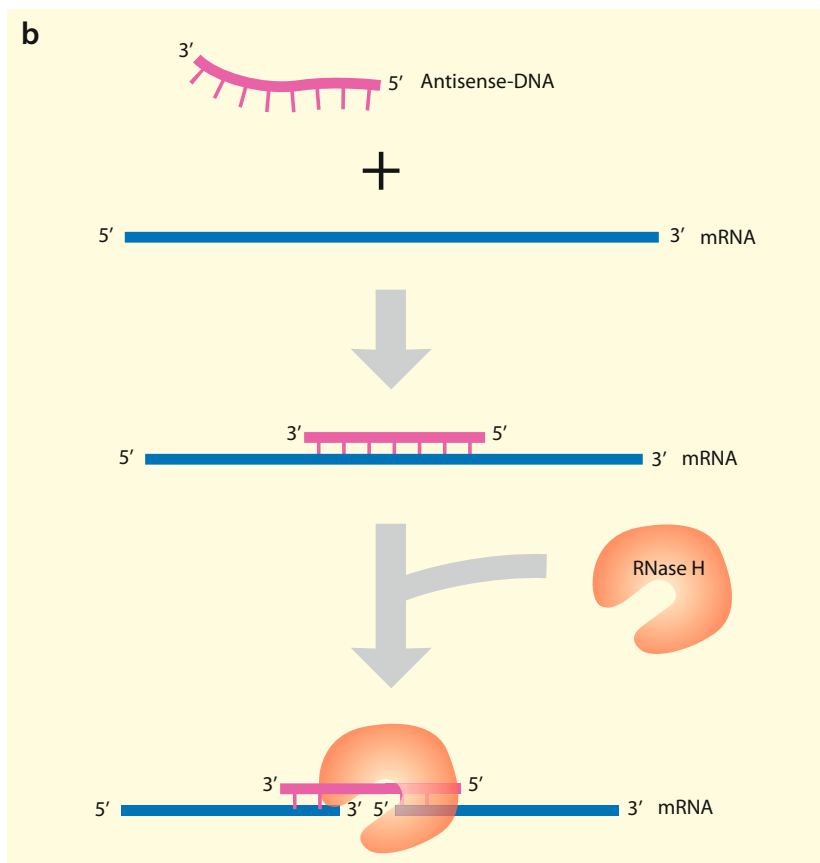
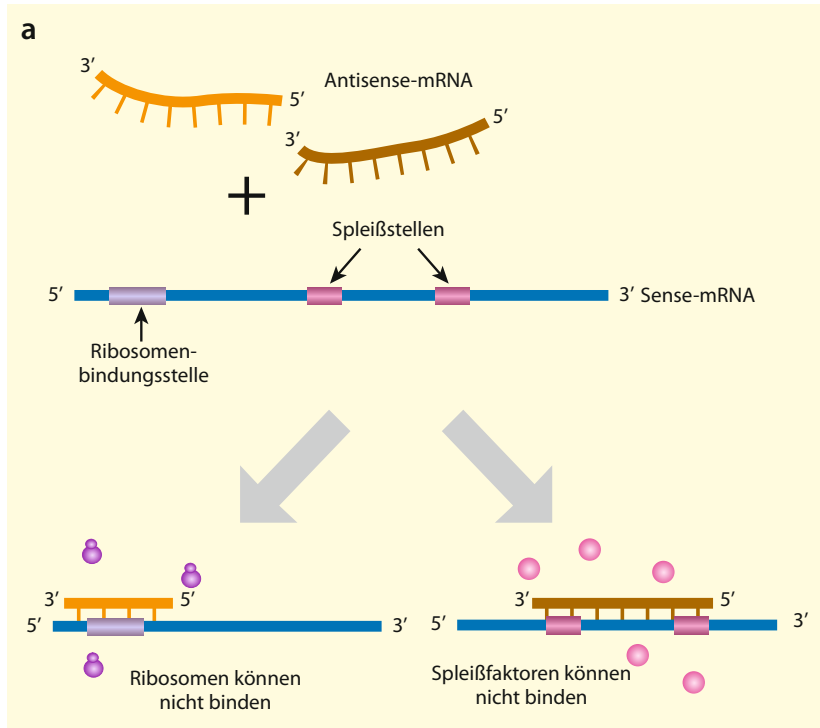
Antisense-Sequenzen kontrollieren eine Vielzahl biologischer Phänomene

Mittlerweile hat man natürlich vorkommende Antisense-Gene entdeckt, die eine Vielzahl von verschiedenen Prozessen kontrollieren. Ein Beispiel stammt aus *Neurospora*. Dieser Pilz folgt in seinem Wachstum einem streng festgelegten Schema, das auf circadianen Rhythmen beruht, er bildet Hyphen nur zu bestimmten Tageszeiten aus. Viele Mutanten wurden identifiziert, die einem solch strengen Zeitregime nicht folgen. Die von den Mutationen betroffenen Gene sind Regulatoren des circadianen Rhythmus von *Neurospora*. Eines der ersten identifizierten Gene des circadianen Rhythmus war *frequency (frq)*.



5.1 Antisense-RNA ist komplementär zur Messenger-RNA

Bei der Transkription beider DNA-Stränge entstehen zwei verschiedene RNA-Moleküle, links die mRNA und rechts die Antisense-RNA. Diese haben komplementäre Sequenzen und können eine doppelsträngige RNA bilden.



5.2 Antisense-RNA blockiert die Proteinsynthese

a Die komplementäre Sequenz der Antisense-RNA bindet an spezifische Regionen auf der mRNA. Dadurch können die Ribosomenbindungsstelle oder der für das Spleißen notwendige Verzweigungspunkt blockiert werden.

b Antisense-DNA markiert mRNA für den Abbau. Bindet Antisense-DNA an mRNA, entsteht eine Heteroduplex aus RNA und DNA, die die RNase H für den Abbau der mRNA aktiviert.

Mutationen in diesem Gen verändern die Häufigkeit der Hyphenbildung. Die Menge an *frq*-mRNA verändert sich, wobei die höchsten Konzentrationen während des Tages auftreten und die niedrigsten nachts. Interessanterweise variiert die Menge der Antisense-*frq*-RNA ebenfalls aber gegenläufig, mit den niedrigsten Konzentrationen tagsüber und den höchsten in der Nacht. *Neurospora*-Isolate, die keine Antisense-*frq*-RNA synthetisieren, haben einen gestörten circadianen Rhythmus. Der genaue Mechanismus der Kontrolle ist jedoch unbekannt. Außerdem werden Antisense- und Sense-mRNAs durch Licht induziert und reagieren damit direkt auf die Umweltbedingungen, um den korrekten Rhythmus aufrechtzuerhalten.

Die Verwendung von Antisense-Sequenzen für die Regulation der Genexpression ist in der Natur so weit verbreitet, dass Wissenschaftler begannen, in den verschiedenen Genomen nach Antisense-Sense-Partnern zu suchen und deren Zahl zu ermitteln. Für die Suche nach Sequenzen, die die Funktion einer Antisense-Sequenz haben könnten, entwickelte man Computeralgorithmen. Im menschlichen Genom fand man 1600 unterschiedliche Partner. Die interessanteste Entdeckung waren kleine, nichtcodierende, regulatorische RNAs, die als **MikroRNAs (miRNAs)** bezeichnet werden und die die Genexpression über einen Antisense-Mechanismus inhibieren (s. unten). Durch den Einsatz von Computern identifizierte man beim Menschen zusätzliche 250 mögliche MikroRNAs. Da diese jedoch nur etwa 20 Nucleotide lang sind, ist eine eindeutige Zuordnung mithilfe des Computers schwierig.

Beispiele für natürliche Antisense-Kontrolle

- Kontrolle der Replikation des ColE1-Plasmids: RNAI- und RNAII-mRNA sind Sense-/Antisense-Partner, die die DNA-Polymerase daran hindern, mit der Replikation des Plasmids zu beginnen. Die Menge an Antisense-RNAI bestimmt, wie häufig die Replikation initiiert wird.
- Kontrolle der Inaktivierung des X-Chromosoms: Antisense-RNA bindet an das *Xist*-Gen, verhindert dessen Expression und somit die Inaktivierung des X-Chromosoms.
- Kontrolle des circadianen Rhythmus in *Neurospora*: Die Tageszeit bestimmt, wann der Pilz Hyphen ausbildet, indem die Menge von Antisense- und Sense-mRNA des *frq*-Gens reguliert wird. Die Menge an Antisense- und Sense-mRNA wird durch Licht- und Dunkelzyklen kontrolliert.
- Eisenstoffwechsel in Bakterien: FatB und RNA α sind Antisense- und Sense-Partner, die die Regulation der Eisenaufnahme in dem Fischpathogen *Vibrio anguillarum* kontrollieren. Ist reichlich Eisen vorhanden und eine Aufnahme des Eisens nicht notwendig, dann verhindern größere Mengen an RNA α die Expression von *fatA* und *fatB*. Herrscht Eisenmangel, dann müssen die Bakterien Eisen aus ihrer Umgebung aufnehmen. RNA α -mRNA wird abgebaut und *fatA* und *fatB* werden exprimiert.
- Kontrolle der Expression des HIV-1-Gens: Antisense-*env*-mRNA bindet an das Rev-Response-Element (RRE) auf der *env*-mRNA. Blockiert die Antisense-Sequenz das RRE, wird das Env-Protein nicht synthetisiert. Fehlt die Antisense-*env*-mRNA, wird das Env-Protein hergestellt.
- Kontrolle des RNA-Editings: Zwischen den komplementären Exon- und Intronsequenzen des Gens für den glutamatgesteuerten Ionenkanal im menschlichen Gehirn bilden sich Antisense-Sense-Schleifen. Diese Schleifen werden durch eine dsRNA-spezifische Adenosin-Desaminase (DRADA) erkannt, die das Adenosin durch Desaminierung in Inosin umwandelt. Dadurch wird die Sequenz der endgültigen mRNA und somit auch die des Proteins verändert – die Permeabilität des Ionenkanals ändert sich.
- Alternatives Spleißen der Schilddrüsenhormonrezeptor-mRNA: Ausgehend von dem Locus für den Schilddrüsenhormonrezeptor wird Antisense-mRNA transkribiert, die das Spleißen des *c-erbA α* -Gens inhibiert. Zwei alternativ gespleißte Transkripte ergeben den normalen Schilddrüsenhormonrezeptor und einen Rezeptor, der als eine Art Falle dient und kein Hormon bindet. Diese beiden Formen modulieren die zelluläre Reaktion auf das Schilddrüsenhormon.
- Kontrolle der Entwicklung durch den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF): Der bFGF kontrolliert verschiedene Entwicklungs- und Reparaturprozesse, einschließlich der Mesoderminduktion, des Neuritenwachstums, der Differenzierung und der Angiogenese (der Entwicklung von Blutgefäßen). Antisense-*bFGF*-mRNA bindet während der Entwicklung von *Xenopus laevis* (dem Afrikanischen Krallenfrosch) an zelluläre *bFGF*-mRNA und sorgt so für deren Abbau.
- Kontrolle von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren: Der Transkriptionsfaktor HIF-1 (engl. *hypoxia-induced factor*) ist ein dimeres basisches Helix-Schleife-Helix-Protein, das Gene anschaltet, die mit dem Sauerstoff- und Glucosestoffwechsel

assoziiert sind, einschließlich der Transporter 1 und 3 und der glykolytischen Enzyme. Die Antisense-mRNA-Menge wird durch die Menge an Sauerstoff in der Umgebung moduliert.

Organismen haben Antisense-Gene und Mikro-RNAs, die an eine Ziel-mRNA binden und so deren Translation in ein Protein verhindern. Sie modulieren eine große Zahl von Prozessen, einschließlich der Hyphenbildung in *Neurospora*, der allgemeinen Entwicklung und der Replikation.

Antisense-Oligonucleotide

Im Labor lässt sich Antisense-mRNA mithilfe von zwei verschiedenen Methoden herstellen (Abb. 5.3). Die einfachste Methode ist die chemische Synthese von Oligonucleotiden, die komplementär zum Zielgen sind. Die Oligonucleotide werden anschließend in die Zelle injiziert oder Zellen werden damit transformiert (s. unten). Alternativ kann man das interessierende Gen in umgekehrter Orientierung klonieren, sodass bei der Transkription Antisense-mRNA entsteht. Der Zielorganismus wird mit dem Vektor, der das *anti*-Gen trägt, transformiert.

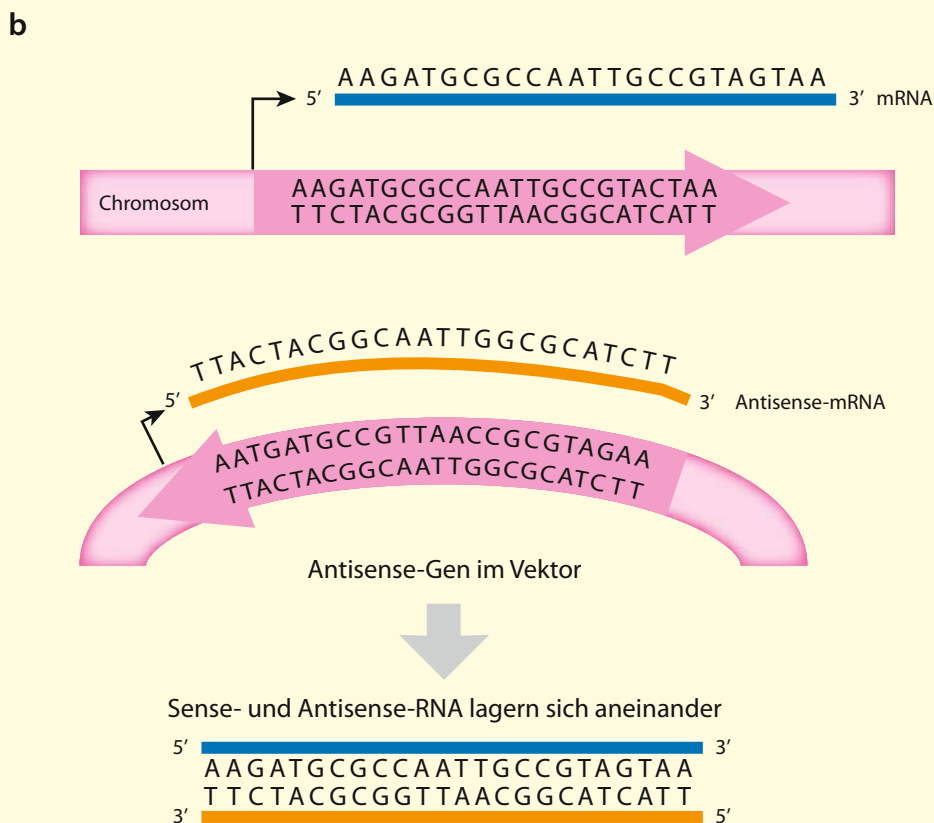
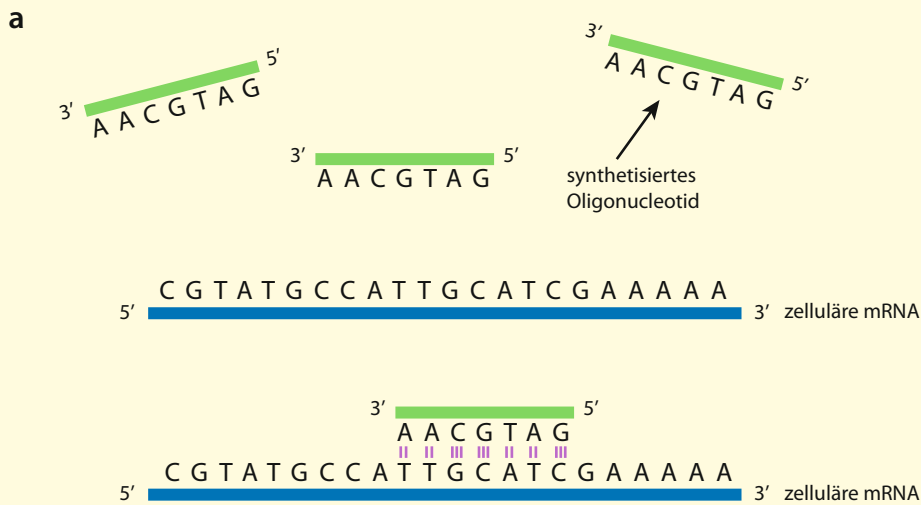
Chemisch synthetisierte Antisense-Oligonucleotide bestehen aus DNA statt aus RNA. Dafür gibt es zwei Gründe. DNA ist im Labor stabiler als RNA, und die DNA-Synthese ist ein etabliertes und automatisiertes Verfahren. In der Zelle sind die DNA-Oligonucleotide dennoch sehr anfällig für einen Abbau durch Endonucleasen; daher werden sie auf verschiedene Weise chemisch modifiziert, um die intrazelluläre Stabilität zu erhöhen. Die am häufigsten durchgeführte Veränderung ist der Austausch eines der Sauerstoffatome, die keine Brücke bilden, gegen ein Schwefelatom (Abb. 5.4), es entsteht ein **Phosphorthioat-Oligonucleotid**. Der Phosphor wird dadurch zu einem Stereozentrum; eines der beiden Diastereomere widersteht dem Abbau durch eine Nuclease, das andere ist jedoch immer noch sensitiv, wodurch die Hälfte der Antisense-Moleküle in der Zelle funktionsfähig ist. Eine solche Modifikation beeinflusst die Löslichkeit der Oligonucleotide oder ihre Empfindlichkeit gegenüber einem Abbau durch RNase H nicht. Diese Typen von Antisense-Oligonucleotiden wurden entwickelt, um Krebs wie das Melanom und einige Formen des

Lungenkrebses zu hemmen. Die häufigste Nebenwirkung von Phosphorthioat-Oligonucleotiden sind unspezifische Wechselwirkungen, insbesondere mit Proteinen, die mit schwefelhaltigen Molekülen interagieren.

Bei zwei anderen Modifikationen ist die Zahl unspezifischer Wechselwirkungen geringer als bei den Phosphorthioat-Oligonucleotiden. Zum einen macht die Addition einer *O*-Alkylgruppe an das 2'-OH der Ribose das Oligonucleotid resistent für einen Abbau durch DNase und RNase H (s. Abb. 5.4). Der Einbau eines Amins in den Ribosering und die dadurch hervorgerufene Umwandlung einer C₅-Ribose in einen Morpholinring führt zu **Morpholino-Antisense-Oligonucleotiden** (s. Abb. 5.4). Zusätzlich zum Morpholinring ersetzt ein zweites Amin ein Nichtbrückensauerstoffatom, wodurch eine **Phosphordiamidatbindung** entsteht. Dieses Amin neutralisiert den geladenen Phosphodiester eines typischen Oligonucleotids. Der Verlust der Ladung beeinflusst die Aufnahme der Moleküle in die Zelle, doch alternative Methoden wurden entwickelt, um diese Antisense-Moleküle in die Zelle zu schleusen (s. unten). Beide Arten von modifizierten Oligonucleotiden sind resistent gegenüber RNase H. Daher fördern sie den Abbau der mRNA-DNA-Hybridsequenz nicht. Ihre Verwendung ist somit auf die Blockierung der Spleißstellen in dem Prä-mRNA-Transkript oder der Ribosomenbindungsstellen beschränkt.

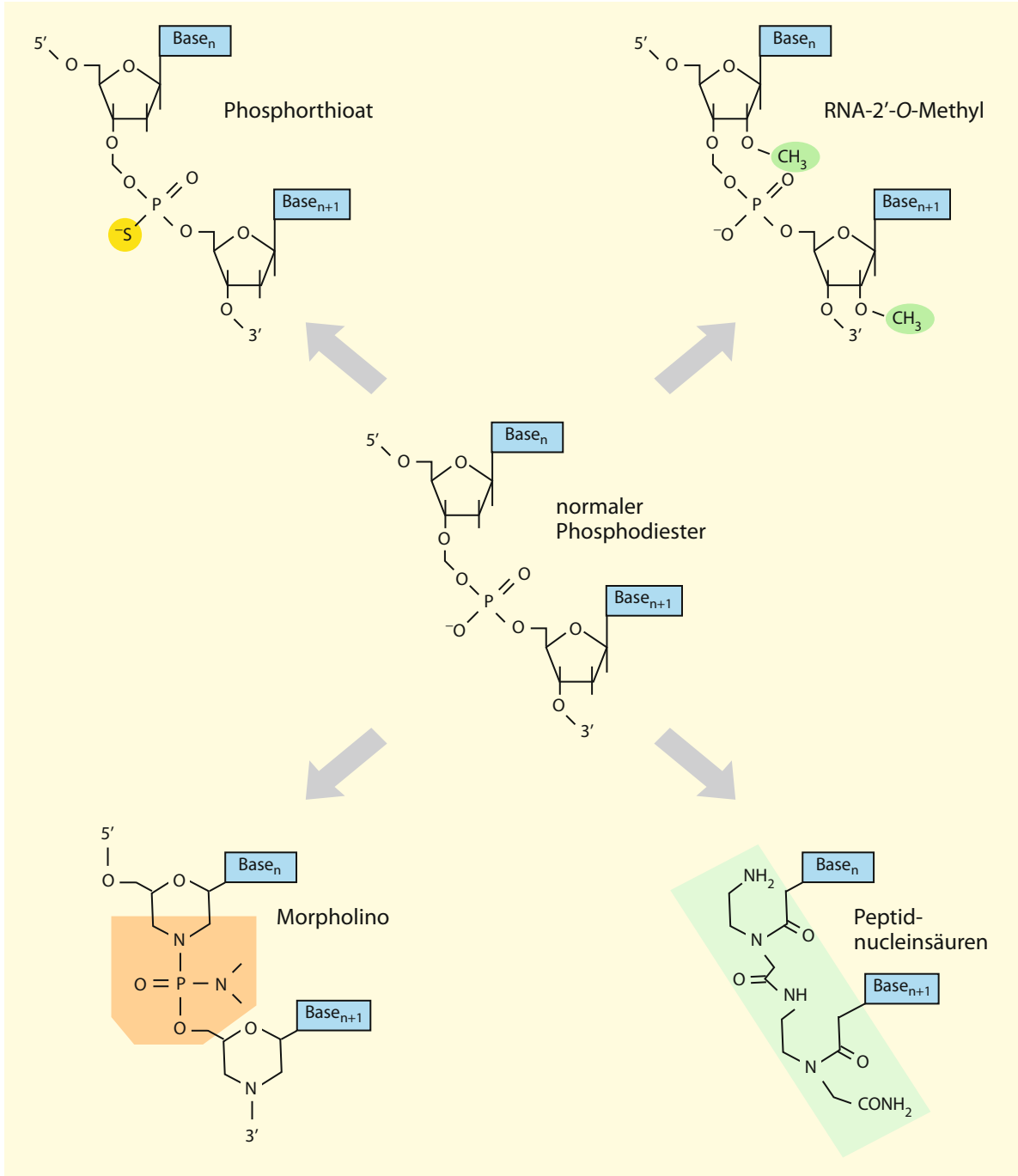
Die am stärksten abgewandelten Oligonucleotide sind die **Peptidnucleinsäuren (PNAs)**, bei denen die üblichen Nucleinsäurebasen mit einem Polypeptidrückgrat verknüpft sind (das normalerweise in Proteinen vorkommt) statt mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat (s. Abb. 5.4). Das Polypeptidrückgrat wurde so modifiziert, dass die RNA-Basen den gleichen Abstand zueinander haben wie bei einem typischen Oligonucleotid. Der Abstand ist entscheidend für die Funktion, da die Basen einer PNA zu den Basen der Ziel-RNA passen müssen. Dieses Molekül ist ebenfalls nicht geladen und wirkt über einen von der RNase-H-Aktivität unabhängigen Mechanismus wie Morpholino-Antisense-Oligonucleotide. Antisense-PNA wurden entwickelt, um die Translation des viralen Transkripts von HIV, *gag-pol*, und die Translation von zwei Genen zu inhibieren, die an der Entstehung von Krebs beteiligt sind, *Ha-ras* und *bcl-2*.

Wie zuvor bereits besprochen, müssen Antisense-Oligonucleotide, die resistent gegenüber RNase H sind, zu Spleißstellen und/oder Ribosomenbindungsstellen passen, um die Ziel-mRNA zu blockie-



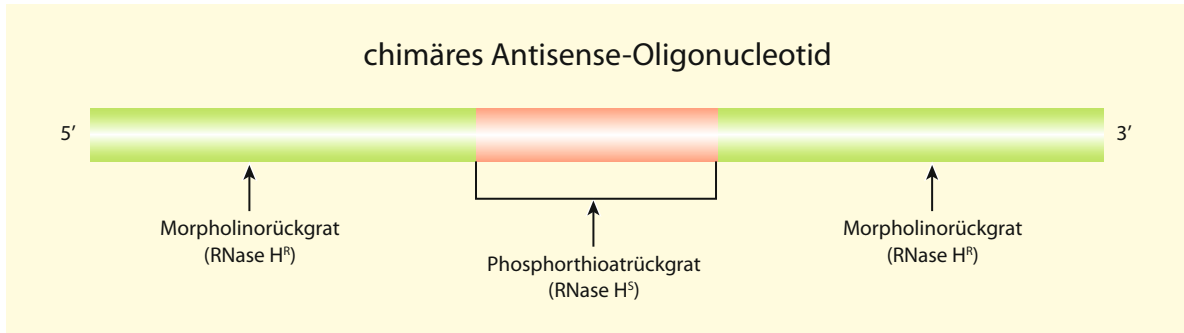
5.3 Die Synthese von Antisense-Sequenzen im Labor

a Antisense-Oligonucleotide. Kleine Oligonucleotide werden chemisch synthetisiert und in die Zelle injiziert, um die Translation der mRNA zu blockieren. **b** Antisense-Gene. Gene werden in umgekehrter Orientierung kloniert, sodass der Sense-Strang transkribiert wird. Es entsteht Antisense-RNA, die sich an die normale mRNA lagert und deren Expression verhindert.



5.4 Modifikationen von Oligonucleotiden

Der Austausch eines Nichtbrückensauerstoffes durch Schwefel (oben links) erhöht die Resistenz des Oligonucleotids gegenüber dem Abbau durch eine Nuclease. Die Addition einer O-Alkylgruppe an das 2'-OH der Ribose (oben rechts) macht das Oligonucleotid widerstandsfähiger gegenüber dem Abbau durch eine Nuclease und durch RNase H. Morpholino-Antisense-Oligonucleotide und Peptidnucleinsäuren sind zwei weitere wesentliche Veränderungen eines Standardoligonucleotids (unten links und rechts). Beide Moleküle sind resistent gegenüber einem Abbau durch RNase H. Diese RNase-H-resistenten Oligonucleotide zielen auf die für das Spleißen notwendigen Verzweigungspunkte oder Ribosomenbindungsstellen, um die Translation der Ziel-mRNA zu verhindern.



5.5 Chimäre Oligonucleotide enthalten RNase-H-sensitive Kerne, um die Ziel-mRNA abzubauen

Chimäre Oligonucleotide werden mithilfe verschiedener Reaktionen hergestellt. Die Kernregion ist für RNase H sensitiv, die äußeren Bereiche sind dagegen RNase-H-resistent. Hybridisiert das Oligonucleotid mit den Zielmolekülen in der Zelle, dann wird die RNase H das Hybrid aus Oligonucleotid und mRNA nur an der Stelle spalten, an der die zentrale Domäne eine Heteroduplex bildet. RNase H wird dagegen keine unspezifischen Komplexe aus chimären Oligonucleotiden und der falschen mRNA spalten.

ren. In einigen Fällen sind diese Sequenzen in der Ziel-mRNA nicht gut charakterisiert, sodass modifizierte Oligonucleotide nutzlos sind. Die Herstellung von gemischten oder chimären Antisense-Oligonucleotiden kann die Wirkung der RNase H auf die mRNA wieder herstellen. Der Forscher kann die modifizierten Strukturen daher nutzen, um den Abbau zu verhindern (s. unten). Bei diesen chimären Antisense-Oligonucleotiden enthält der zentrale Bereich eine kurze, etwa 7 bp lange Sequenz aus Phosphorthioatbindungen, die RNase-H-sensitiv sind. Der Bereich wird von Sequenzen flankiert, die eine der RNase-H-resistenten Modifikationen tragen (Abb. 5.5). Die flankierenden Bereiche enthalten 2'-O-Methylgruppen, Morpholinstrukturen oder sogar PNAs. Die chimären Moleküle haben jede verfügbare Region der mRNA zum Ziel, bis auf Spleißstellen oder Ribosomenbindungsstellen.

Um die Oligonucleotide zu stabilisieren und sie vor einem Abbau in der Zelle zu schützen, wird die Oligonucleotidstruktur auf unterschiedliche Weise modifiziert.

Erkennt die RNase H das Antisense-Oligonucleotid nicht, dann muss das Oligonucleotid an die Ribosomenbindungsstelle oder den für das Spleißen notwendigen Verzweigungspunkt binden, um die Translation zu inhibieren.

Chimäre Antisense-Oligonucleotide beinhalten eine Kernsequenz aus etwa sieben Nucleotiden, die durch RNase H erkannt wird. RNase H baut das Oligonucleotid und seine Ziel-mRNA ab.

Antisense-Oligonucleotide können das Spleißen beeinflussen

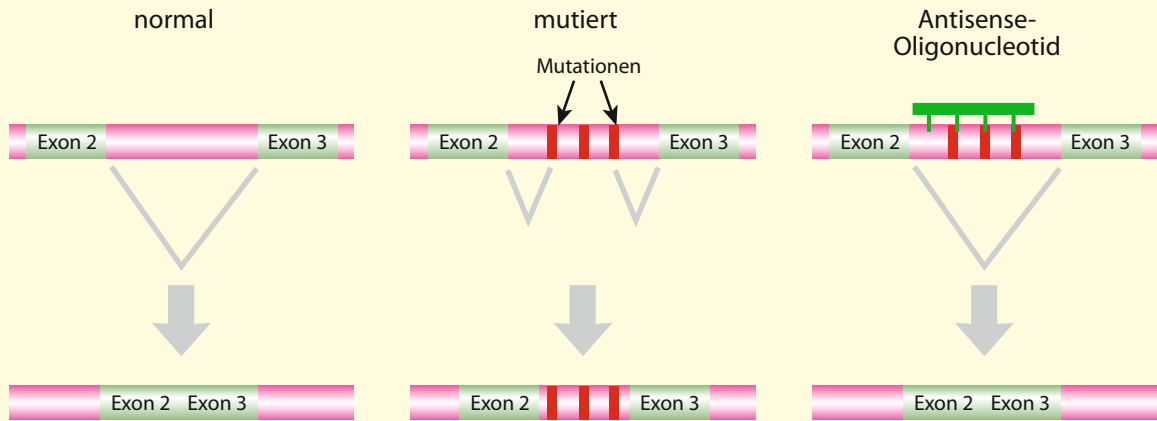
Alternatives Spleißen wird häufig eingesetzt, um die Genexpression in Eukaryoten zu kontrollieren. Einige Erkrankungen werden durch anormale Spleißmuster verursacht. So beruht die β -Thalassämie, eine Blutkrankheit, bei der rote Blutkörperchen nicht ausreichend Sauerstoff transportieren, auf einem anormalen Spleißen der Prä-mRNA des β -Globins. Es wurden Morpholino-Antisense-Oligonucleotide entwickelt, die die mutierte Spleißstelle zwischen Exon 2 und 3 des β -Globins zum Ziel haben. Dieses Antisense-Oligonucleotid korrigiert das Spleißmuster und stellt das korrekte Protein in roten Blutkörperchen wieder her, die aus dem Blut von Patienten mit β -Thalassämie gewonnen wurden (Abb. 5.6a).

Ausgehend vom *Bcl-x*-Gen des Menschen werden durch alternatives Spleißen zwei unterschiedliche Proteine gebildet. *Bcl-xL*, das längere Protein, enthält ein codierendes Segment zwischen Exon 1 und 2, welches dem kürzeren *Bcl-xS*-Protein fehlt. Das *Bcl-xL*-Protein fördert das Zellwachstum, indem es die Apoptose inhibiert, *Bcl-xS* hat einen gegenteiligen Effekt und führt über Apoptose zum Zelltod (s. Kap. 20). Bei manchen Krebsformen wird das längere Protein überexprimiert. Die Entwicklung einer Methode, die die *Bcl-xL*-Expression inhibiert und die Expression von *Bcl-xS* verstärkt, könnte in den Krebszellen zur Apoptose führen,

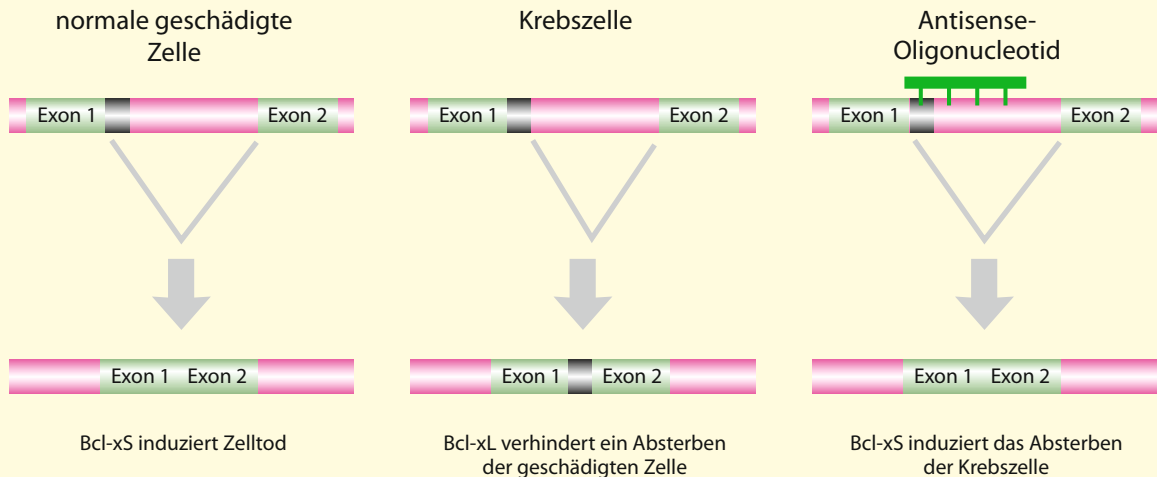
wodurch die Zellen absterben. Antisense-2'-O-Methyloligonucleotide für die Spleißstelle auf der Prä-mRNA verhindern, dass das längere Proteinmolekül entsteht. Das Bcl-xS-Protein wirkt dann dem Krebswachstum entgegen, indem es die Apoptose

fördert (s. Abb. 5.6b). Krebszellen, die durch eine Antisense-Therapie kontrolliert wurden, zeigten auch eine höhere Sensitivität für Chemotherapeutika, weil die Möglichkeit der Apoptose wiederhergestellt war.

a β -Thalassämie



b Das Verhältnis von Bcl-xL zu Bcl-xS reguliert, ob die Krebszelle lebt oder abstirbt



5.6 Antisense-Oligonucleotide korrigieren Spleißfehler

a β -Thalassämie ist eine Blutkrankheit, bei der sich zwischen Exon 2 und 3 zusätzliche Spleißstellen befinden (Mitte). Antisense-Oligonucleotide, die die Verzweigungspunkte dieser Spleißstellen blockieren, stellen die ursprüngliche Struktur des Gens für das Spleißen wieder her (rechts). **b** Das Bcl-x-Gen führt durch alternatives Spleißen zu zwei verschiedenen Proteinen. Bcl-xS wird in einer normalen defekten Zelle gebildet und fördert den Zelltod über Apoptose (links). Einige Krebszellen synthetisieren kein Bcl-xS. Stattdessen entsteht über alternatives Spleißen die längere Form, Bcl-xL, die die Krebszelle vor Apoptose schützt (Mitte). Antisense-Oligonucleotide, die den für das Spleißen und die Synthese von Bcl-xL notwendigen Verzweigungspunkt blockieren, machen die Synthese des Bcl-xS-Proteins wieder möglich und sensibilisieren die Krebszelle schließlich wieder für die Apoptose.

Antisense-Oligonucleotide werden eingesetzt, um die genetischen Veränderungen, die zu β -Thalassämie und einigen Krebsarten führen, zu korrigieren.

Probleme bei der Verwendung von Antisense-Oligonucleotiden

Es gibt zwei Hauptprobleme, die mit der Antisense-Technologie verbunden sind. Das wichtigste ist das Design der Antisense-Oligonucleotide selbst. Obwohl die mRNA in der Regel als lineares Molekül dargestellt wird, faltet sich das Molekül und bildet zwischen verschiedenen Regionen Watson-Crick-Basenpaarungen aus. Außerdem bilden einige Regionen Schleifen und Kehlen, wodurch sich eine dreidimensionale Struktur ergibt. Einige der Zielregionen lagern sich durch Basenpaarung an andere Molekülbereiche, und wiederum andere Zielregionen können tief in der dreidimensionalen Struktur verborgen sein. Dadurch wird die Suche nach einer Ziel-mRNA, die für ein im Labor konstruiertes Oligonucleotid zugänglich ist, problematisch.

Die zweite große Herausforderung für die Antisense-Technologie sind unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Molekülen. Wie bereits erwähnt, haben Phosphorothioat-Oligonucleotide das Potenzial, an zelluläre Proteine zu binden, die mit den schwefelhaltigen Verbindungen interagieren und so das Oligonucleotid daran hindern, an die Ziel-mRNA zu binden. Außerdem können kleine Abschnitte eines Oligonucleotids auch unspezifisch an mRNA-Sequenzen binden. Normalerweise bliebe das ohne Folgen, weil der Heteroduplexbereich kurz und wenig stabil ist. Ist das Oligonucleotid jedoch sensitiv für RNase H, dann kann die Endonuclease die falsche mRNA abbauen. Der homologe Bereich von RNA und DNA muss für die RNase-H-Erkennung nur eine Länge von etwa 7 bp haben, sodass auch eine kurze instabile Heteroduplex ausreichen kann, um das Enzym zu aktivieren. Damit das Antisense-Oligonucleotid für nur eine mRNA spezifisch ist, muss der homologe Bereich eine Länge von etwa 20 bp haben. Eine Methode, dieses Problem zu lösen, ist die Verwendung von chimären Antisense-Oligonucleotiden, weil RNase H ausschließlich in der Kernregion des chimären Moleküls spalten kann (Abb. 5.7). Auch wenn die Enden des chimären

Antisense-Oligonucleotids eine 7 bp lange homologe Region auf einer mRNA, die kein Zielmolekül darstellt, finden, kann das Enzym diese unspezifischen Ziele nicht spalten.

Wenn die Ziel-mRNA ausgeprägte Sekundärstrukturen aufweist, ist es für Antisense-Oligonucleotide schwierig, an die vorgesehene Stelle zu binden.

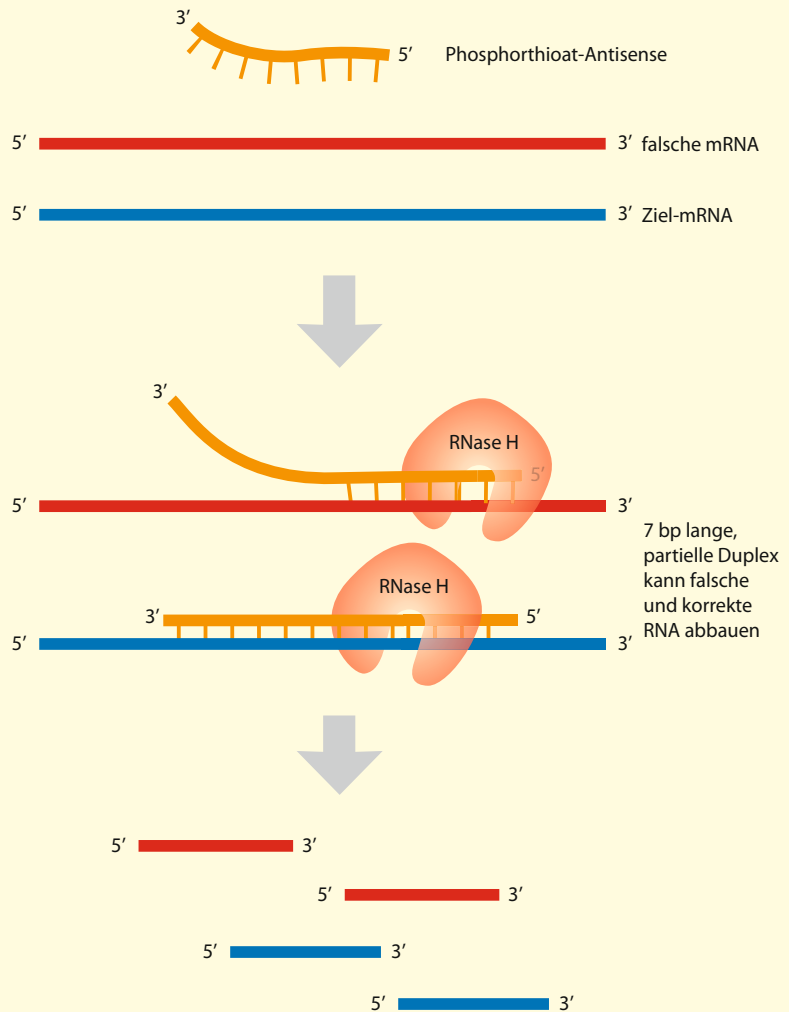
Chimäre Antisense-Oligonucleotide werden eingesetzt, um den unspezifischen Abbau von mRNA zu verhindern, die nicht das Zielmolekül darstellt.

Die Expression von Antisense-RNA-Konstrukten

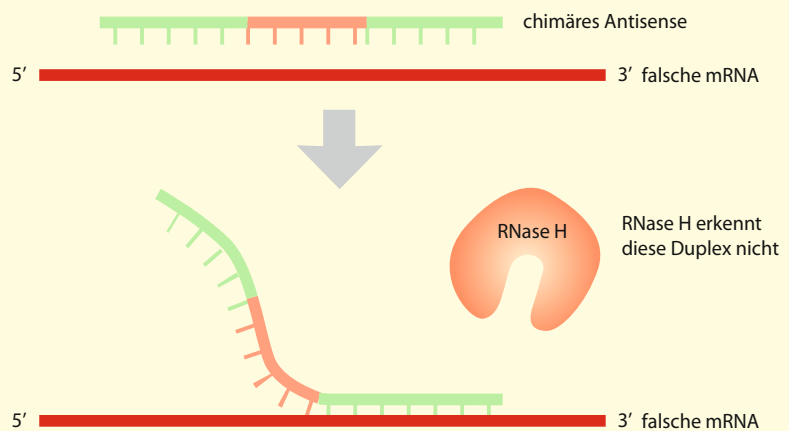
Statt Antisense-Oligonucleotide zu verwenden, kann Antisense-RNA auch ausgehend von einem Vektor, der in eine Zelle geschleust wurde, transkribiert werden. (Das Einschleusen von Fremd-DNA in pflanzliche und tierische Zellen wird in Kapitel 14 und 15 ausführlich besprochen.) Zunächst wird das Zielgen in entgegengesetzter Orientierung kloniert, sodass bei der Transkription die Antisense-RNA gebildet wird und nicht die Sense-mRNA (s. Abb. 5.3b). Man geht davon aus, dass durch dieses Verfahren die zelluläre Ziel-mRNA durch die Bildung einer Heteroduplex aus Sense- und Antisense-RNA inaktiviert wird. Voraussetzung für die Bildung einer Heteroduplex ist, dass beide RNAs ungefaltet vorliegen. Hat eine der RNAs eine stabile Sekundär- oder Tertiärstruktur, dann kann das Konstrukt aus beiden RNAs in der Zelle unter Umständen nicht entstehen.

Der Vorteil einer internen Synthese von Antisense-RNA ist, dass sich die Antisense-Expression kontrollieren lässt. Wird das Antisense-Gen hinter einen induzierbaren Promotor kloniert, dann wird die Antisense-RNA so lange nicht synthetisiert, bis das Gen durch ein spezifisches Signal oder spezifische Bedingungen induziert wird. Dies kann für eine gewebespezifische Expression des Antisense-Gens nützlich sein. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Antisense-RNA über einen langen Zeitraum kontinuierlich exprimiert wird. Eine umständliche und kostspielige Zugabe von externen Antisense-Oligonucleotiden entfällt daher.

a Phosphorthioat-Antisense



b Chimäres Antisense



5.7 Oligonucleotide können unspezifische Wirkungen haben

a RNase H kann auch an einer nichtbeabsichtigten Stelle spalten, wenn das Oligonucleotid an einen kurzen homologen Bereich von 7 bp bindet. **b** Chimäre Oligonucleotide verhindern einen unspezifischen Abbau durch RNase H. Binden die RNase-H-resistenten Enden des chimären Oligonucleotids unspezifisch an die mRNA, dann verhindert die Struktur des Oligonucleotids die Erkennung und Spaltung der Heteroduplex durch RNase H.

Ein Zielgen kann in entgegengesetzter Richtung kloniert und so ein Antisense-Vektor hergestellt werden. Wird dieses Gen in einer Zelle exprimiert, dann bindet die Antisense-RNA an die endogene mRNA und verhindert so deren Translation in ein Protein.

Die gezielte Verabreichung von Antisense-Therapeutika

Das Einschleusen von Antisense-Oligonucleotiden in Zellen erfordert spezielle Methoden, da die Moleküle die Zellwand nicht selbst durchqueren können, um wirksam zu sein. Ein Antisense-Oligonucleotid zur gewünschten Position in der Zelle zu dirigieren, ist ein weiteres Problem bei der Durchführung von Antisense-Therapien. Der Mechanismus der Aufnahme von Oligonucleotiden ist nicht bekannt, doch es handelt sich um einen aktiven Prozess, d.h. die Aufnahme ist abhängig von der Temperatur, der Konzentration der Oligonucleotide und dem Zelltyp. Man nimmt an, dass die Moleküle über Endo- oder Pinocytose aufgenommen werden. (Pinocytose ist der Endocytose ähnlich, doch sind die in die Zelle aufgenommenen Tröpfchen bei der Pinocytose kleiner.) Außerdem ist es möglich, dass die Oligonucleotide bei geringen Konzentrationen über einen membrangebundenen Rezeptor in die Zelle geschleust werden, bei höheren Konzentrationen jedoch über Endo- oder Pinocytose.

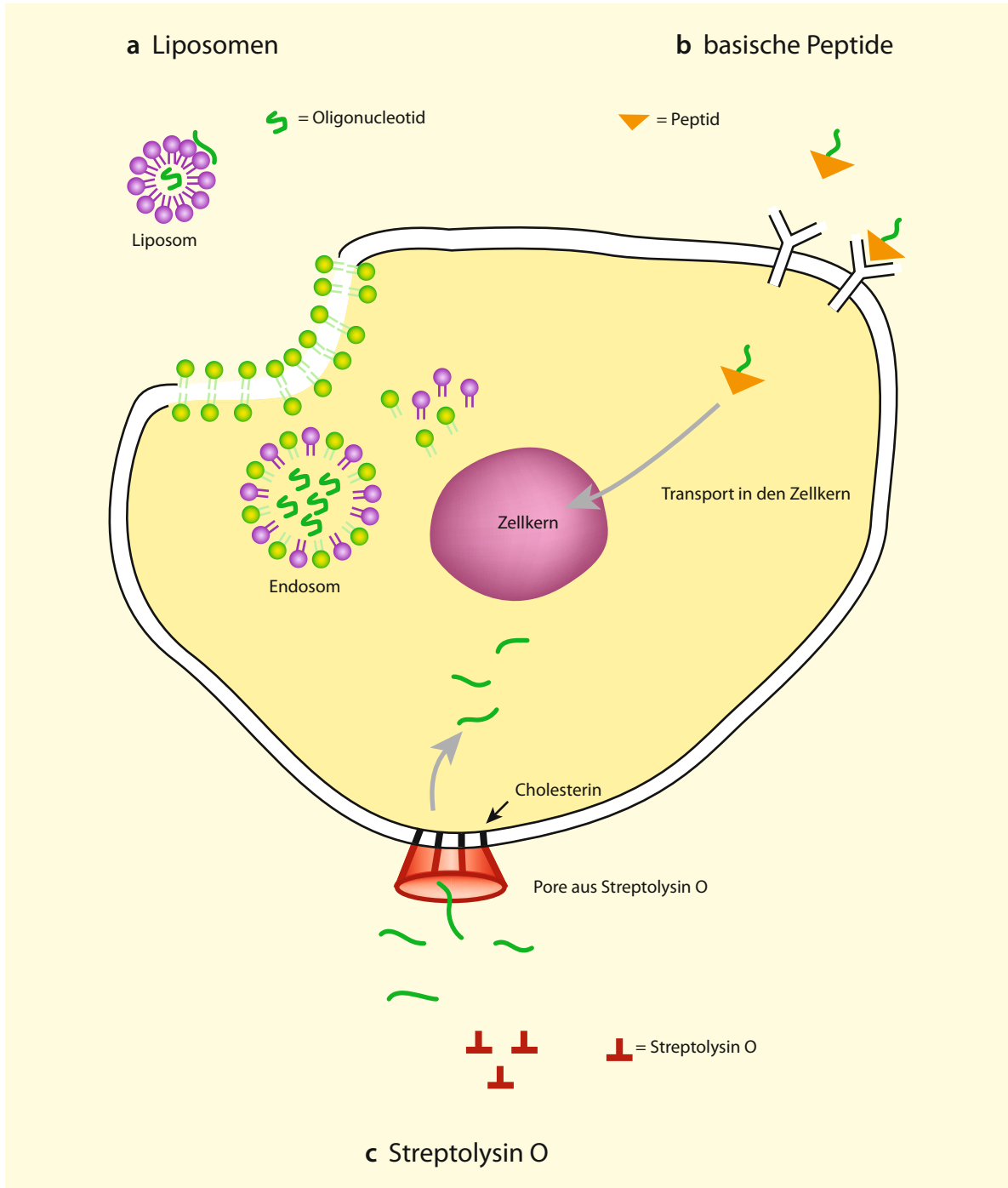
Eine übliche Methode, mit der Oligonucleotide in Zellen transportiert werden, ist, sie in **Liposomen** zu verpacken (Abb. 5.8a). Liposomen sind kleine Vesikel mit einer Phospholipiddoppelschicht und Cholesterin. Ob das Liposom neutral oder positiv geladen ist, hängt von dem Phospholipid ab, das für seine Herstellung verwendet wird. Ist es positiv geladen, dann lagern sich die Oligonucleotide an die Außenseite des Liposoms oder sie befinden sich in der wässrigen Phase im Innern. Positiv geladene Liposomen werden von der negativ geladenen Zelloberfläche angezogen, und das Liposom wird zusammen mit den Oligonucleotiden durch Endocytose aufgenommen. Einige Liposomen enthalten „Hilfsmoleküle“, die die endosomale Membran instabil machen, sodass der Liposomeninhalt direkt in das Cytoplasma freigesetzt wird. Andere Trans-

portsysteme sind kationische Polymere wie Poly-L-Lysin und Polyethylenimin. Diese wirken wie zuvor beschrieben über elektrostatische Wechselwirkungen, doch sie sind toxisch, wenn sie in die Zelle aufgenommen werden; daher werden sie nur selten verwendet.

Wird für den Transport ein endosomaler Weg (z.B. über Liposomen) gewählt, dann werden die Antisense-Oligonucleotide mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit abgebaut oder nicht in das Cytoplasma freigesetzt. Um dieses Problem zu lösen, müssen an **basische Peptide** gebundene Antisense-Oligonucleotide in die Zelle geschleust werden (s. Abb. 5.8b). Zu diesen Peptiden gehören das Tat-Protein aus HIV-1, der N-terminale Abschnitt der H2A-Untereinheit des Agglutininproteins aus dem Grippevirus und das Antennapediapепtid aus *Drosophila* (das normalerweise ein Transkriptionsfaktor ist). Diese Peptide werden in den Zellkern geschleust und auch gekoppelte Antisense-Oligonucleotide gelangen direkt in den Kern.

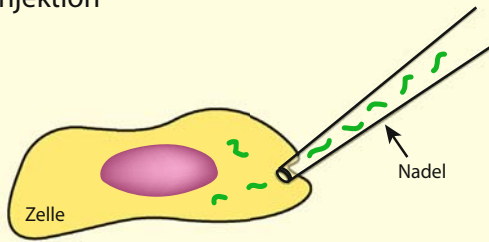
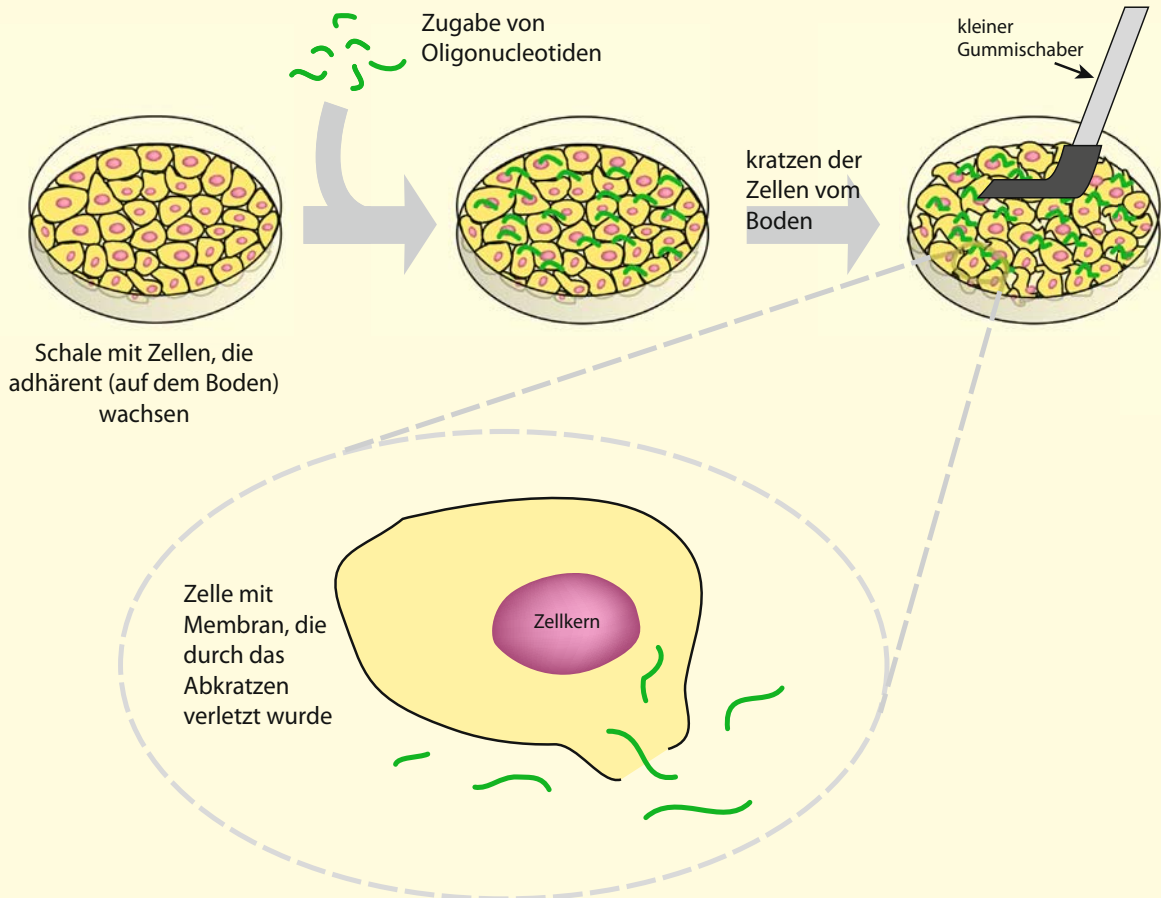
Andere Verfahren, um Oligonucleotide in die Zelle zu transportieren, erfordern eine chemische oder manuelle Zerstörung der Membran (s. Abb. 5.8). Membranporen können durch die Anwendung von **Streptolysin O** (s. Abb. 5.8c) oder durch eine Elektroporation entstehen (s. Kap. 3). Streptolysin O ist ein Toxin aus Streptokokken, das nach der Bindung an Cholesterin in der Membran aggregiert und eine Pore bildet. Das Oligonucleotid durchquert die Pore und gelangt direkt in das Cytoplasma. Antisense-Oligonucleotide lassen sich ebenfalls durch Mikroinjektion in die Zelle schleusen, doch diese Methode ist am Patienten nicht durchführbar, sondern nur im kleinen Maßstab für Zellkulturen geeignet (Abb. 5.9). Ein weiteres mechanisches Verfahren ist das **scrape-loading** (s. Abb. 5.9). Hier werden adhären wachsende Zellkulturen vorsichtig von der Petrischale gekratzt, während sich die Oligonucleotide in dem Medium befinden. Das Entfernen der Zellen verursacht wahrscheinlich kleine Verletzungen der Zellmembran, sodass die Oligonucleotide in das Cytoplasma gelangen können.

Antisense-Oligonucleotide können mithilfe von Endocytose oligonucleotidgefüllter Liposomen, durch die Kopplung an basische Peptide, die in den Zellkern geschleust werden, durch Poren, welche von Streptolysin O gebildet werden, oder durch mechanische Scherung in die Zielzellen gelangen.



5.8 Möglichkeiten der Antisense-Oligonucleotid-Aufnahme durch Zellen

a Liposomen sind kugelförmige Strukturen, die aus Lipiden und Cholesterin bestehen. Die Oligonucleotide werden entweder im Zentrum eingekapselt oder lagern sich an die Oberfläche des Liposoms. Der Komplex wird über Endocytose in die Zelle geschleust und der Inhalt in das Cytoplasma freigesetzt. **b** Basische Peptide sind natürlich vorkommende Proteine, die normalerweise in den Zellkern transportiert werden. Das Oligonucleotid kann mit diesen Peptiden fusioniert werden und auf diese Weise in den Zellkern gelangen. **c** Streptolysin O, ein Toxin aus Streptokokken, aggregiert mit der Zellmembran und bildet eine porenähnliche Struktur. Die Oligonucleotide durchqueren die Zellmembran durch diese Poren.

a Mikroinjektion**b scrape-loading****5.9 Mikroinjektion und scrape-loading**

a Oligonucleotide lassen sich direkt mithilfe einer feinen Nadel in Zellen injizieren. Die Mikroinjektion kann an einzelnen Zellen in Zellkulturen durchgeführt werden. **b** Das *scrape-loading* ist ein mechanisches Verfahren, um die Oligonucleotide in kultivierte Zellen einzuschleusen. Kratzt man die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes, dann werden die Zellmembranen geschädigt und die Oligonucleotide können in die Zellen gelangen. Danach schließt sich die Membran wieder, und das Oligonucleotid ist in der Zelle gefangen.

RNA-Interferenz nutzt Antisense-Sequenzen, um die Genexpression zu hemmen

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine kürzlich entdeckte Variante der endogenen Genregulation, bei der kurze doppelsträngige RNA-Abschnitte (dsRNA) einen Enzymkomplex aktivieren, der eine Ziel-mRNA abbaut. Im Wesentlichen verringern die kurzen dsRNA-Abschnitte die Syntheserate des Zielproteins, indem die komplementäre mRNA abgebaut wird. RNAi wurde bei Pflanzen, Pilzen, Säugern, Fliegen und Würmern entdeckt und hat unterschiedliche Namen. Die verschiedenen Organismen zeigen Variationen des grundlegenden Mechanismus. Mutationen in den Enzymen, die an RNAi beteiligt sind, wirken sich auf ein weites Spektrum zellulärer Prozesse aus. Einige beeinflussen die Entwicklung eines Organismus, andere verändern die Abwehr von Viren, insbesondere von RNA-Viren. In anderen Fällen erhöhen Mutationen mit Einfluss auf RNAi die Bewegung von Transposons, was vermuten lässt, dass RNAi auch das Springen der Transposons verhindert. Alle diese Prozesse beruhen auf der Regulation der Translation bzw. des mRNA-Abbaus.

RNAi lässt sich in zwei Phasen einteilen, die Initiationsphase und die Effektorphase. Die Initiation beginnt mit der Bildung der dsRNA, die hauptsächlich aus drei Quellen stammt. Die erste Quelle sind infizierende RNA-Viren, die sich über ein dsRNA-Zwischenprodukt replizieren, das RNAi auszulösen vermag. Eine Theorie geht davon aus, dass sich der RNAi-Mechanismus entwickelt hat, um diese infizierenden Viren abzuwehren. Als nächste Quelle kommt die genomische DNA des Organismus infrage. Diese enthält Sequenzen, welche MikroRNAs codieren. Diese MikroRNAs vermitteln spezifisch RNAi (s. unten). Schließlich kann dsRNA auch bei einer anormalen Transkription gentechnisch veränderter Gene entstehen (Abb. 5.10a). Während des nächsten Schrittes der Initiation bindet dsRNA an eine Endonuclease, die als **Dicer** bezeichnet wird. Dieses Enzym schneidet die dsRNA in kleine Fragmente mit einer Länge von 21 bis 23 Nucleotiden, die **kurze interferierende RNAs** (engl. *short interfering RNAs*, **siRNAs**) genannt werden (s. Abb. 5.10b). Dicer ist eine dsRNA-abhängige RNA-Endonuclease, die zur RNase-III-Familie gehört. Die siRNAs besitzen am 3'-Ende einen für Enzyme des RNase-III-Typs typischen Überhang aus zwei Nucleotiden. Das

5'-Ende wird durch eine Kinase phosphoryliert, die mit Dicer assoziiert ist, wodurch die siRNAs für die nächste Phase vorbereitet werden.

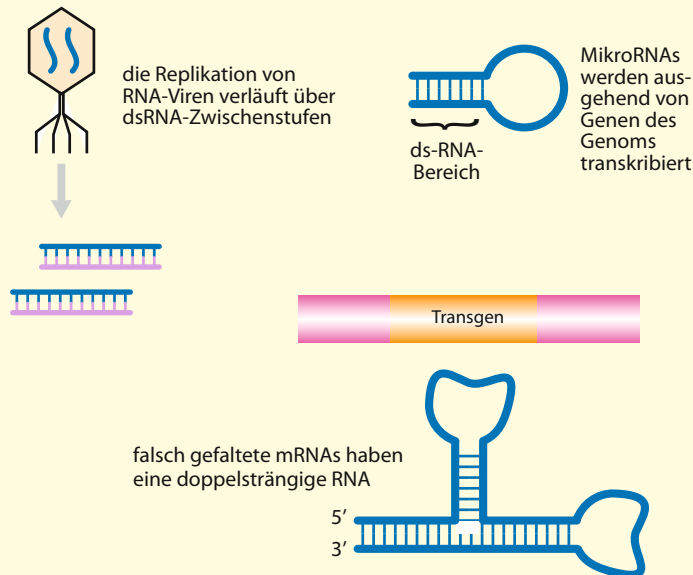
In der Effektorphase überträgt Dicer die siRNA auf einen Ribonucleoproteinkomplex, der als **RNA-induzierter Silencingkomplex (RISC)** bezeichnet wird. RISC wird durch siRNAs aktiviert und nutzt eine RNA-Helikase, um die doppelsträngigen Fragmente zu Einzelsträngen zu entwinden. Die einzelsträngige Antisense-siRNA wird anschließend für die Suche nach komplementären Sequenzen im Cytoplasma genutzt. Bindet RISC an komplementäre Sequenzen, dann werden diese zunächst durch eine im RISC-Komplex vorhandene Endonuclease gespalten und durch Exonucleasen des Cytosols weiter abgebaut. Dadurch werden alle mRNA-Moleküle zerstört, die zur siRNA komplementär sind. Sowohl Dicer als auch der RISC-Komplex sind abhängig von ATP als Energielieferanten. Die Antisense-siRNA bestimmt die Ziel-mRNA und stellt sicher, dass mRNAs nicht unspezifisch abgebaut werden.

RNAi erfordert nicht viele siRNA-Moleküle. Tatsächlich reichen nur etwa 50 Kopien von siRNA aus, um die gesamte Ausstattung einer Zelle mit Ziel-mRNA abzubauen. Dass sich so viele Zielmoleküle mit so wenigen siRNA-Kopien zerstören lassen, beruht auf einer Verstärkung des Systems durch das Enzym **RNA-abhängige RNA-Polymerase** (engl. *RNA-dependent RNA-Polymerase*, **RdRP**), durch dessen Aktivität dsRNA entsteht. RdRP nutzt das geschnittene Zielmolekül als Matrize für die Synthese von mehr dsRNA-Molekülen. Dicer erkennt diese neue dsRNA und spaltet sie in mehr siRNAs, wodurch sich die Zahl an si-RNA-Molekülen stark erhöht (Abb. 5.11).

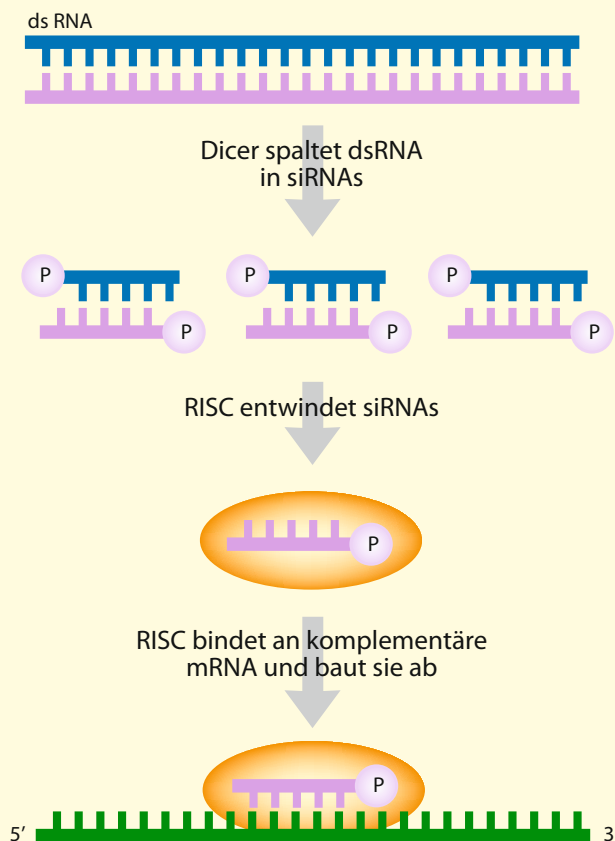
RNAi beeinflusst die Genexpression auch durch die Umwandlung von Kopien des Zielgens in Heterochromatin (Abb. 5.12). Die siRNA dirigiert heterochromatinbildende Enzyme und Proteine zum Zielgen. Ist die geöffnete und exprimierte DNA-Konformation einmal in Heterochromatin umgewandelt, wird keine mRNA mehr synthetisiert. Daher vermag RNAi die Genexpression auch dauerhaft zu reprimieren.

RNAi verläuft in zwei Phasen. Während der Initiationsphase wird die als siRNA bezeichnete doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nucleotiden gebildet, und in der Effektorphase entsteht aus der doppelsträngigen siRNA eine einzelsträngige Matrize, die dazu dient, komplementäre mRNA zu finden und zu zerstören.

a Quellen der dsRNA

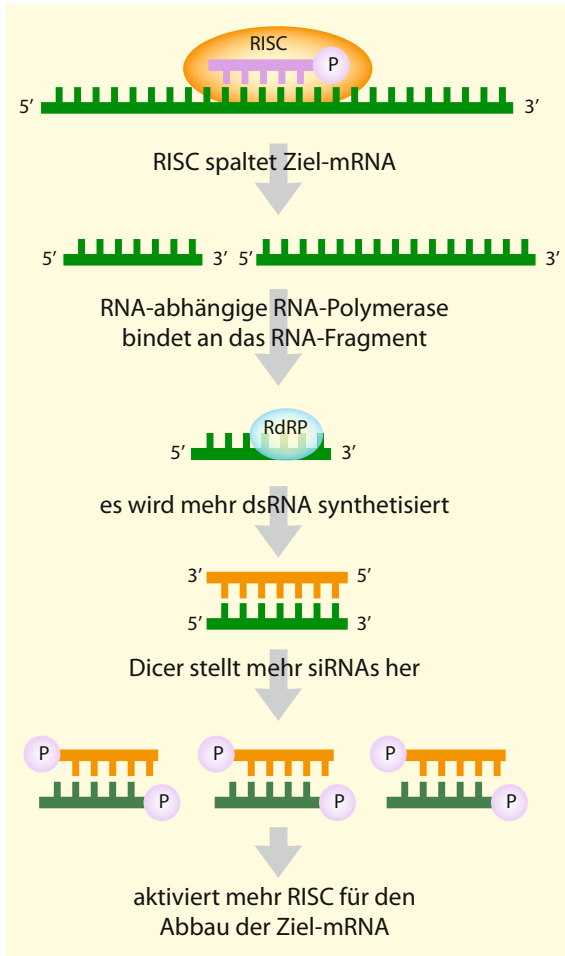


b RNA-Interferenz



5.10 Zellulärer Mechanismus von RNAi

a Doppelsträngige RNA löst RNA-Interferenz aus. dsRNA wird von Viren während einer Infektion gebildet, sie wird in Form von MikroRNA im Genom codiert, oder sie entsteht durch Überexpression von Transgenen. **b** Durch RNA-Interferenz werden alle RNA-Moleküle abgebaut, die zu den doppelsträngigen RNA-Abschnitten komplementär sind. Zunächst erkennt Dicer die dsRNA und schneidet das Molekül in Stücke aus 21 bis 23 Nucleotiden. Eine Kinase phosphoryliert das 5'-Ende jedes Fragments. Als nächstes entwindet RISC die siRNAs und nutzt einen Strang für die Suche nach komplementären mRNAs, die durch assoziierte Enzyme abgebaut werden.



5.11 Verstärkung der RNAi

Nachdem die RISC-assoziierten Enzyme die komplementäre mRNA in der Zelle gespalten haben, bindet ein weiteres Enzym, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, an einige der entstandenen Fragmente. RdRP synthetisiert komplementäre Stränge und es entstehen mehr doppelsträngige RNAs. Dicer erkennt diese Fragmente und durch die Aktivität des Enzyms entsteht wiederum mehr siRNA.

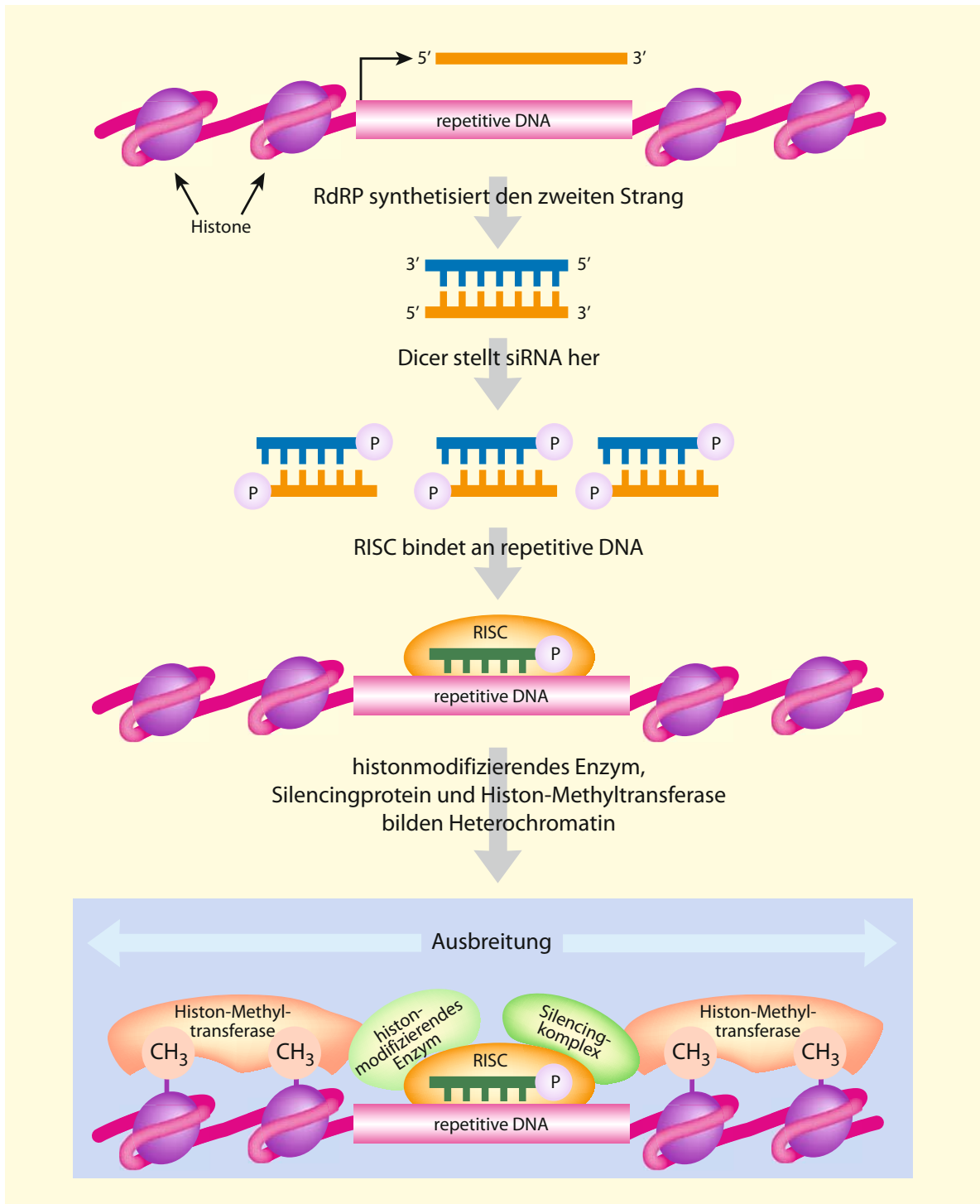
RNAi in Pflanzen und Pilzen

RNAi wurde zuerst in Pflanzen beobachtet und als **posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS)** bezeichnet. Das Phänomen wurde erstmals bemerkt, als die ersten Versuche zur Herstellung transgener Pflanzen merkwürdige Ergebnisse hervorbrachten. Schleuste man die Kopie eines Gens ein, um die Menge eines bestimmten Proteins zu erhöhen,

dann wurden sowohl die eingebaute Kopie (d.h. das Transgen) als auch das ursprünglich vorhandene Gen stillgelegt. Das Ergebnis war eine Pflanze, die weniger Zielprotein produzierte anstatt mehr. So bauten Forscher im Jahr 1990 z.B. ein Gen in Petunien ein, wodurch die Blüten eine dunkel violette Färbung erhalten sollten. Stattdessen hatten die Pflanzen weiße Blüten. Sowohl das Transgen als auch das endogene Gen wurden reprimiert. Ein ähnliches Phänomen, das man als **quelling** bezeichnete, wurde in *Neurospora* beobachtet. Nach der Entdeckung von RNAi in *Caenorhabditis elegans* erkannte man, dass RNAi, PTGS und **quelling** über denselben Mechanismus wirken. Keiner dieser Prozesse beeinflusste das Ausmaß der Transkription. In den Zellen befand sich eine Menge mRNA des Transgens. Nach einiger Zeit lag die mRNA des Transgens allerdings in zwei Fragmenten vor, was vermuten ließ, dass sie durch eine Endonuclease geschnitten wurde. Zu späteren Zeitpunkten fand man zunehmend kleinere Fragmente der Ziel-mRNA, was auf Exonucleasen hinwies, die die größeren Fragmente zerschneiden. Und schließlich wurden die Gene in Heterochromatin umgewandelt.

Wie induziert eine zusätzliche Genkopie ein System, das durch dsRNA aktiviert wird? Eine Theorie ist, dass eine Überproduktion bestimmter mRNAs die RdRP aktiviert, um aus diesem Überschuss dsRNA zu synthetisieren. Diese dsRNA aktiviert Dicer und es entstehen siRNAs, die die mRNA abfangen, welche sowohl von dem Transgen stammt als auch von jedem nahe verwandten endogenen Gen. Ein alternativer Erklärungsansatz geht davon aus, dass bei der Expression bestimmter Transgene einige mRNA-Bereiche Doppelstränge ausbilden, wodurch **Haarnadelschleifen** entstehen. Diese Abschnitte vermögen Dicer ebenfalls zu aktivieren. Die genetische Analyse der Modellpflanze *Arabidopsis* hat gezeigt, dass die RdRP von dem SDE-1-Gen codiert wird, welches für das Silencing des Transgens notwendig ist, aber nicht für die antivirale RNAi. (Im zweiten Fall würde die virale RNA-Polymerase dsRNA synthetisieren und die pflanzliche RdRP wäre nicht notwendig.) Das spricht für das erste Modell des transgenesteuerten Silencings.

Die interessanteste Eigenschaft von PTGS ist, dass sich das Silencing von einem Pflanzenteil zum nächsten ausbreiten kann. Pflanzen lassen sich pfropfen, d.h., ein Blatt oder ein Zweig können auf eine andere Pflanze übertragen werden. Ein aufgepfropfter Spross, der ein Transgen trägt, das durch PTGS stillgelegt wurde, wird das korrespondierende endogene Gen in der Unterlage (die Pflanze, auf die gepfropft wird) ebenfalls stilllegen. Diese Wirkung von RNAi wandert



5.12 Die Bildung von Heterochromatin durch RNAi

Der RISC-Komplex, der einzelsträngige siRNA enthält, vermag auch komplementäre DNA-Sequenzen zu erkennen und an sie zu binden. Lagert sich RISC an ein sich wiederholendes DNA-Element, dann werden viele histonmodifizierende Enzyme und Silencingkomplexe aktiviert, um diesen Bereich der DNA in Heterochromatin umzuwandeln. Ist dies geschehen, wird die Region nicht länger in mRNA transkribiert.

durch das Gefäßsystem der Pflanze und beeinflusst auch Regionen, die kein Transgen enthalten. Auch in *C. elegans* breitet sich RNAi aus, nicht nur von Gewebe zu Gewebe, sondern auch von den Eltern auf die Nachkommen. Wie es scheint, haben Säugetiere keine Möglichkeit der Verbreitung von RNAi.

Die Fähigkeit zur Verbreitung beruht nicht einzig und allein auf der siRNA. In Pflanzen bildet das Potyvirus einen Inhibitor von RNAi, der als **Hc-Pro** (engl. *helper component proteinase*) bezeichnet wird. Dieses Protein hemmt die Anreicherung von siRNA. Dennoch breitet sich das RNAi-Signal weiterhin in andere Pflanzenteile aus und ruft eine Methylierung der DNA hervor, die die DNA in Heterochromatin umwandelt. Andere virale Gene, die verschiedene Schritte des RNAi-Prozesses inhibieren, werden, so hofft man, den Mechanismus der Ausbreitung entschüsseln helfen.

Andere Bezeichnungen für RNAi-Varianten sind **transkriptionelles Gen-Silencing**, **Cosuppression** und **virusinduziertes Silencing**. Das virusinduzierte Silencing tritt auf, wenn das Virusgenom ein doppelsträngiges RNA-Zwischenprodukt besitzt, das Dicer und RISC induziert. Cosuppression ist eine der ersten Bezeichnungen für PTGS. Transkriptionelles Gen-Silencing bezieht sich auf das Silencing der Genexpression durch die Umwandlung des Gens in Heterochromatin. Der Name „**GENE impedance**“ (**GENEi**) wurde vorgeschlagen, um alle diese Phänomene zusammenzufassen, doch er wird selten verwendet.

Frühe Experimente zur Herstellung transgener Pflanzen wiesen auf ein Phänomen hin, das heute als RNAi bekannt ist. RNAi wird auch als posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS), *quelling*, transkriptionelles Gen-Silencing, Cosuppression und virusinduziertes Silencing bezeichnet.

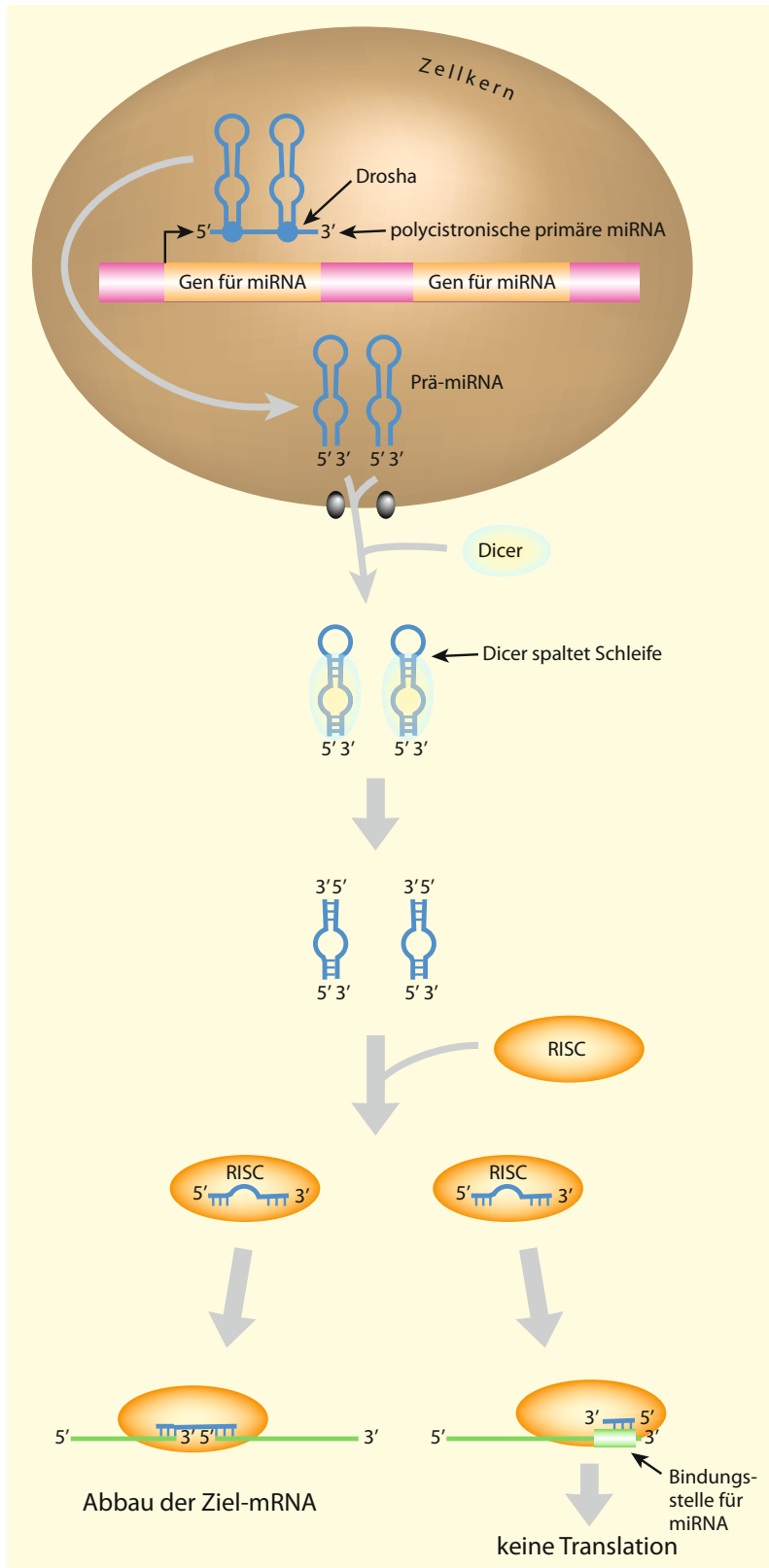
MikroRNAs sind Antisense-Sequenzen, die die Genexpression verändern

Die Entwicklung eines Embryos zum adulten Wurm *C. elegans* erfordert RNAi, damit bestimmte Gene zu den richtigen Zeitpunkten abgeschaltet werden. In diesem Fall wird RNAi nicht durch das Eindrin-

gen von externen Sequenzen wie Transgenen oder Viren verursacht. Während der Entwicklung werden nichtcodierende RNA-Moleküle, bekannt als **MikroRNAs (miRNAs)** vom Genom des Wurms transkribiert. Diese miRNAs regulieren die Genexpression, indem sie die Translation einer entsprechenden Ziel-mRNA blockieren. MikroRNAs, zuerst in *C. elegans* entdeckt, wurden anschließend in verschiedensten Pflanzen und Tieren gefunden, auch im Menschen. RNAi, die durch miRNAs induziert wird, ist dem oben beschriebenen Mechanismus ähnlich. Die Ziel-mRNAs werden durch eine Antisense-Sequenz identifiziert, d.h. die miRNA besitzt Sequenzen, die komplementär sind zu einem Teil der Ziel-mRNA. Einige miRNAs binden an die Ziel-mRNA und verhindern die Initiation der Translation. In anderen Fällen bindet die miRNA an die 3'-UTR-Region der mRNA.

MikroRNAs werden als Vorläufermoleküle, **Prä-MikroRNAs**, transkribiert, die eine Länge von etwa 70 Nucleotiden haben. In *Drosophila* werden miRNAs als polycistronische mRNAs transkribiert, die zunächst durch eine Endonuclease namens Drosha gespalten werden. In Pflanzen können die Prä-MikroRNAs durchaus länger sein und bis zu 300 Nucleotide umfassen. Dicer spaltet diese Moleküle in Abschnitte mit einer Länge von etwa 20 Nucleotiden. Nach der Spaltung des Vorläufermoleküls bildet die freigesetzte miRNA durch komplementäre Basenpaarung eine Stamm-Schleife-Struktur. Dicer erkennt die Stamm-Schleife und schneidet die Schleife, wodurch die beiden Stränge getrennt werden. Der RISC-Komplex trennt die beiden Stränge anschließend. Die miRNA aus Tieren wie *C. elegans* toleriert einige wenige Fehlpaarungen innerhalb der Bindungsdomäne. In Tieren blockiert der Antisense-miRNA-Strang die Translation der Ziel-mRNA (Abb. 5.13), die nicht abgebaut wird. In Pflanzen hingegen muss die MikroRNA perfekt passen. Der Vorgang basiert auf der RISC-vermittelten Erkennung und Spaltung der Ziel-mRNA.

MikroRNAs (miRNAs) modulieren während der Entwicklung vieler Organismen die Expression unterschiedlichster Gene. MikroRNAs werden zunächst als Prä-miRNAs von dem Genom des Organismus transkribiert, zu Stücken aus 21 bis 23 Nucleotiden prozessiert und anschließend von RISC getrennt und zur Zerstörung der komplementären Ziel-mRNA genutzt.



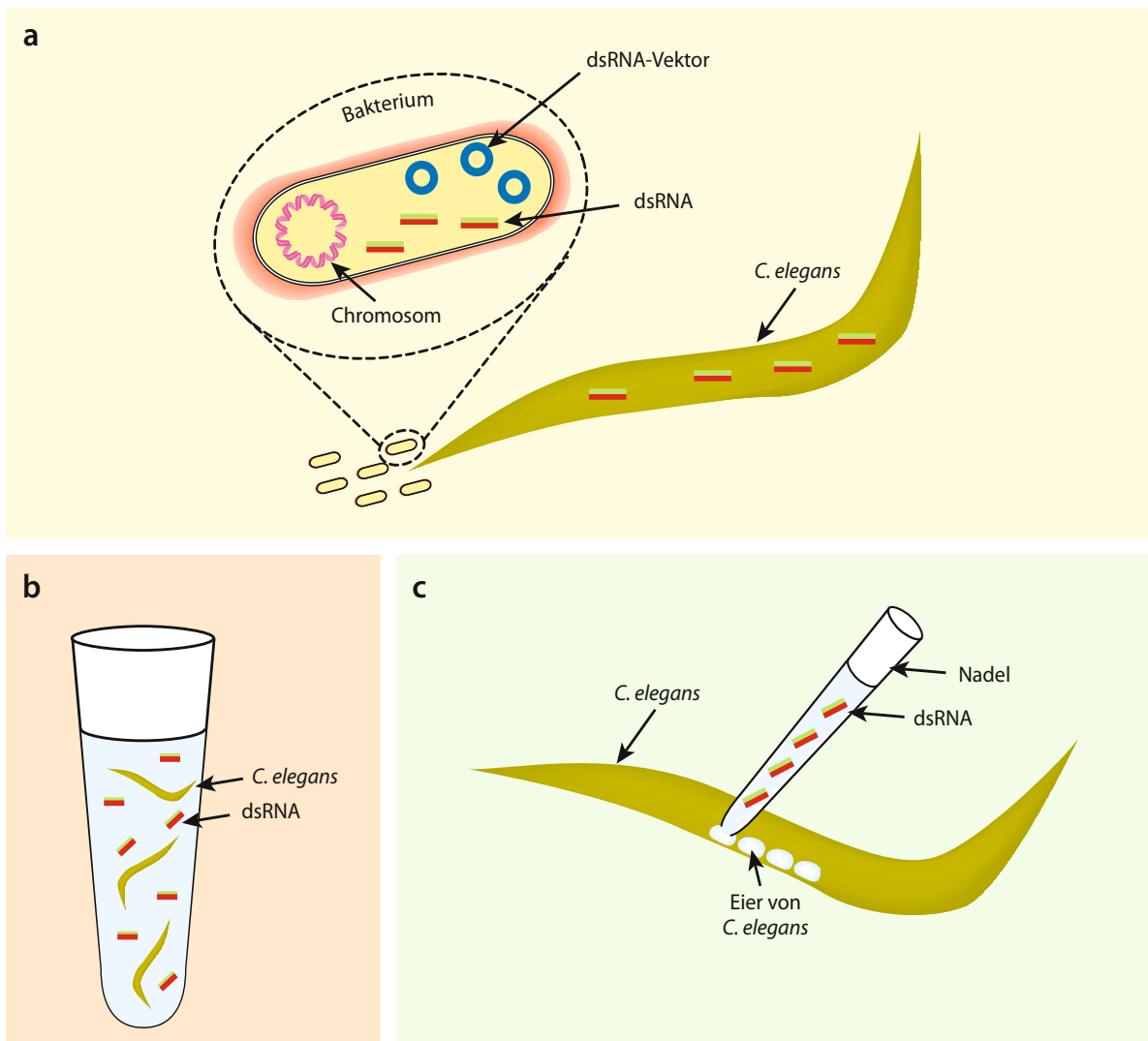
5.13 Die miRNA-vermittelte Inaktivierung der Translation in *Drosophila*

Drosophila besitzt eine Vielzahl von Genen für miRNAs, die die Translation der mRNA während der Entwicklung kontrollieren. Die Gene sind polycistronisch, und ein als Drosha bezeichnetes Enzym schneidet jede Haarnadelstruktur, um die Prä-miRNAs herzustellen. Diese verlassen durch Kernporen den Zellkern. Im Cytoplasma erkennt Dicer diese Sequenzen und schneidet das Ende der Schleife. Es entstehen doppelsträngige miRNAs. Diese werden von RISC erkannt, zu Einzelsträngen entwunden und für die Blockierung der Translation oder für den Abbau komplementärer mRNA eingesetzt.

Anwendungen von RNAi bei der Analyse der Genexpression

Durch die Inhibierung der Translation bietet RNAi die Möglichkeit, ein bestimmtes Protein ohne gentechnische Veränderungen aus einem Organismus zu entfernen. RNAi ist ein leistungsfähiges Werkzeug für die Aufklärung der Funktion eines bestimmten

Proteins innerhalb der Entwicklung. Die Anwendung von RNAi bei der Untersuchung von *C. elegans* ist besonders gut etabliert. Es wurden drei verschiedene Methoden angewendet, um dsRNA-Konstrukte in *C. elegans* einzuschleusen und RNAi zu aktivieren (Abb. 5.14). Der kleine Wurm besitzt die außerordentliche Fähigkeit, DNA oder RNA aufnehmen zu können. Die Würmer werden mit *E. coli*-Bakterien, die die gewünschte dsRNA exprimieren, gefüttert, und der Wurm nimmt die dsRNA in seine Zellen auf. Dicer schneidet die dsRNA in kleine siRNAs,



5.14 Einschleusen von dsRNA in *C. elegans*

a *C. elegans* kann dsRNAs absorbieren, die von Bakterien exprimiert werden und die man dem Wurm als Futter verabreicht hat. **b** *C. elegans* kann dsRNA ebenfalls aus der umgebenden Lösung aufnehmen. **c** Die Injektion von dsRNA in ein Ei löst Gen-Silencing in dem sich entwickelnden Wurm aus.

die RISC aktivieren und schließlich die Ziel-mRNA blockieren. Eine weitere Methode, um die dsRNA einzuschleusen, ist, die Würmer in eine Lösung mit dsRNA zu inkubieren. Die exogene dsRNA wird von dem Wurm absorbiert und aktiviert dort RNAi. Ein drittes Verfahren zur Induktion von RNAi ist die Injektion von dsRNA in Wurmeier. Der Wurm entwickelt sich mit der vorhandenen ssRNA, und RNAi wird in allen Zellen aktiviert. Die Inkubation der Würmer in dsRNA oder das Verfüttern von dsRNA-exprimierenden Bakterien kann unvollständig sein und die Effizienz reicht möglicherweise nicht aus – einige Zellen werden nicht penetriert –, doch da sich das Signal von einer Zelle zur nächsten ausbreitet, sind die Methoden dennoch geeignet. Erstaunlicherweise kann die Wirkung von RNAi von einem Elter an die Nachkommen weitergegeben werden. In den Nachkommen eines Wurms, der ein stillgelegtes Gen besitzt, wird dieses Gen ebenfalls stillgelegt.

Das Einschleusen von dsRNA in *Drosophila* ist nicht so leicht zu bewerkstelligen wie in *C. elegans*. Die Fliegen nehmen keine externe dsRNA auf, indem sie sie fressen oder aus einer Lösung absorbieren. Bei *Drosophila* muss die dsRNA durch Mikroinjektion direkt in das sich entwickelnde Ei eingebracht werden. Die dsRNA wird während der Entwicklung des Embryos in die Zellen absorbiert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sich ein interessierendes Protein in allen Entwicklungsphasen ausschalten lässt. Ist ein Protein für die Entwicklung essenziell, kann eine zu frühe Aktivierung von RNAi die Entwicklung beenden und die Fliege töten. Glücklicherweise besitzt *Drosophila* eine Eigenschaft, die *C. elegans* nicht aufweist. Fliegenzellen können *in vitro* in einer Nährlösung kultiviert werden. Da sich dsRNA in kultivierte Zellen einschleusen lässt, lassen sich diese Zelllinien für eine Analyse der Proteinfunktion durch RNAi nutzen. Wird der Embryo während seiner Entwicklung durch RNAi abgetötet, kann man das entsprechende Protein immer noch in Zellkulturen untersuchen.

C. elegans kann dsRNA aufnehmen und RNAi aktivieren, indem er transgene Bakterien frisst, die die dsRNA exprimieren. Weitere Möglichkeiten sind eine Inkubation in einer dsRNA-Lösung oder die Injektion von dsRNA in die Eier.

Auch *Drosophila* lässt sich als Modellorganismus nutzen, um die Proteinfunktion mittels RNAi zu untersuchen, indem man dsRNA in *Drosophila*-Eier oder kultivierte Zellen injiziert.

RNAi für die Untersuchung von Säugergenen

Eine wichtige Anwendung von RNAi ist die Bestimmung der Funktion von menschlichen Proteinen, die dann als Zielmoleküle für die Therapie von Erkrankungen dienen können. Bis vor kurzem war die Anwendung von RNAi zur Analyse der Funktion von Säugerproteinen nicht möglich. Die Zugabe von dsRNA zu Säugerzellkulturen oder ganzen Mäusen induziert eine starke antivirale Reaktion. Interferon wird produziert, das den Abbau aller RNA-Transkripte und das Abschalten der Proteinsynthese in den Zellen auslöst. Die in *C. elegans* und *Drosophila* angewandte Methode tötet Säugerzellen ab und bis vor kurzem gab es keine Alternativen.

Die Erkenntnis, dass kurze interferierende RNAs (siRNAs) RNAi vermitteln, war der Schlüssel zur Anwendung der Methode in Säugetieren. Statt lange dsRNA zu verwenden wie in *C. elegans* und *Drosophila*, aktivieren in Säugerzellen dsRNA-Moleküle mit einer Länge von weniger als 30 Nucleotiden die entsprechenden Gegenstücke zu Dicer und RISC. Dadurch wird die Expression der Ziel-mRNA unterbunden. Solche kurzen dsRNA-Abschnitte wirken somit wie endogen gebildete siRNA. Wie bereits beschrieben, sind die von Dicer hergestellten siRNAs kurze doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 21 bis 23 Basenpaaren. Außerdem besitzen die siRNAs einen 3'-Überhang aus zwei Basen, der stabiler ist, wenn er aus zwei Uracilresten besteht. Um eine bestimmte Ziel-mRNA in Säugerzellen untersuchen zu können, werden chemisch synthetisierte siRNAs, die zum Zielmolekül komplementär sind und diese Eigenschaften besitzen, entworfen. Ähnlich wie bei Antisense-Oligonucleotiden können diese siRNAs z.B. durch Methylgruppen am 2'-OH der Ribose modifiziert sein, um die Moleküle zu stabilisieren. Der wichtigste und zugleich problematischste Aspekt der siRNA-Konstruktion *in vitro* ist, eine wirksame Sequenz zu finden. Die Sequenz der Ziel-mRNA muss für die siRNA zugänglich sein, was aufgrund der Sekundärstrukturen in der mRNA eine Herausforderung darstellt. Viele geeignete siRNAs werden entworfen, synthetisiert und hinsichtlich der Aktivierung von RNAi überprüft. Diese siRNA-Sequenzen werden ähnlich wie Antisense-Oligonucleotide durch Transfektion, Liposomen und Mikroinjektion in die Säugerzellen geschleust.

Statt siRNA chemisch zu synthetisieren, kann die Ziel-mRNA mit dem gereinigten Dicer gemischt

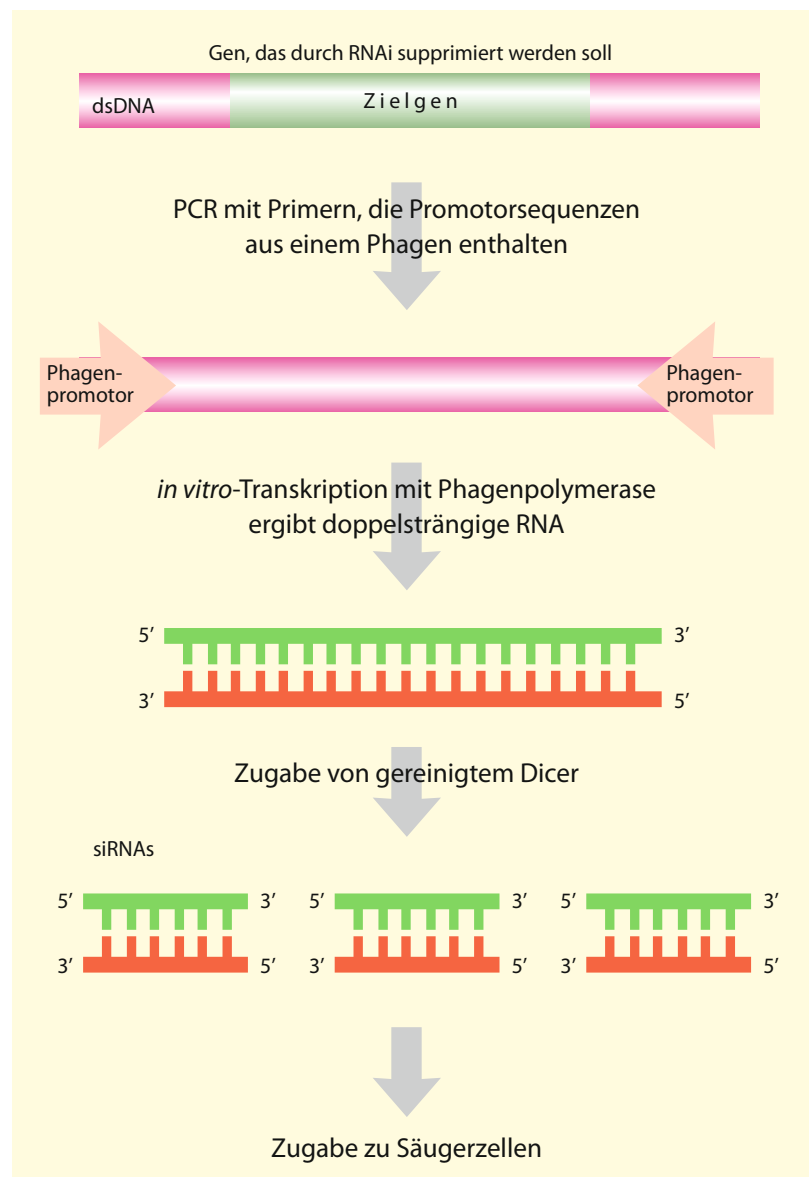
werden, um sie in siRNA-Stücke zu schneiden (Abb. 5.15). Obwohl die Reaktion im Reagenzglas stattfindet, produziert der gereinigte Dicer wie *in vivo* viele siRNAs. Um die Ziel-mRNA zu synthetisieren, wird die Sequenz des ausgewählten Zielgens in einer PCR und mithilfe von PCR-Primern vervielfältigt, die eine Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase enthalten. Die doppelsträngige DNA wird nach der PCR durch die T7-RNA-Polymerase in dsRNA transkribiert. Die RNA-Stücke lagern sich anschließend spontan aneinander und werden mit gereinigtem Dicer gemischt, der die Sequenzen in

viele verschiedene siRNAs spaltet. Mit diesen werden anschließend Säugerzellen transfiziert.

Außerdem lässt sich in Säugerzellen RNAi aktivieren, indem **kurze Haarnadel-RNAs** (engl. *short hairpin RNAs*, **shRNAs**) exprimiert werden, die die Struktur der MikroRNAs nachahmen. Ein Gen für die shRNA wird in einen Vektor kloniert. Das Gen wird entweder von zwei an den Enden liegenden, aber entgegengesetzt orientierten Promotoren transkribiert, oder es entsteht nur ein Transkript, das aber zueinander komplementäre Enden besitzt. Diese werden durch eine schleifenbildende Sequenz unter-

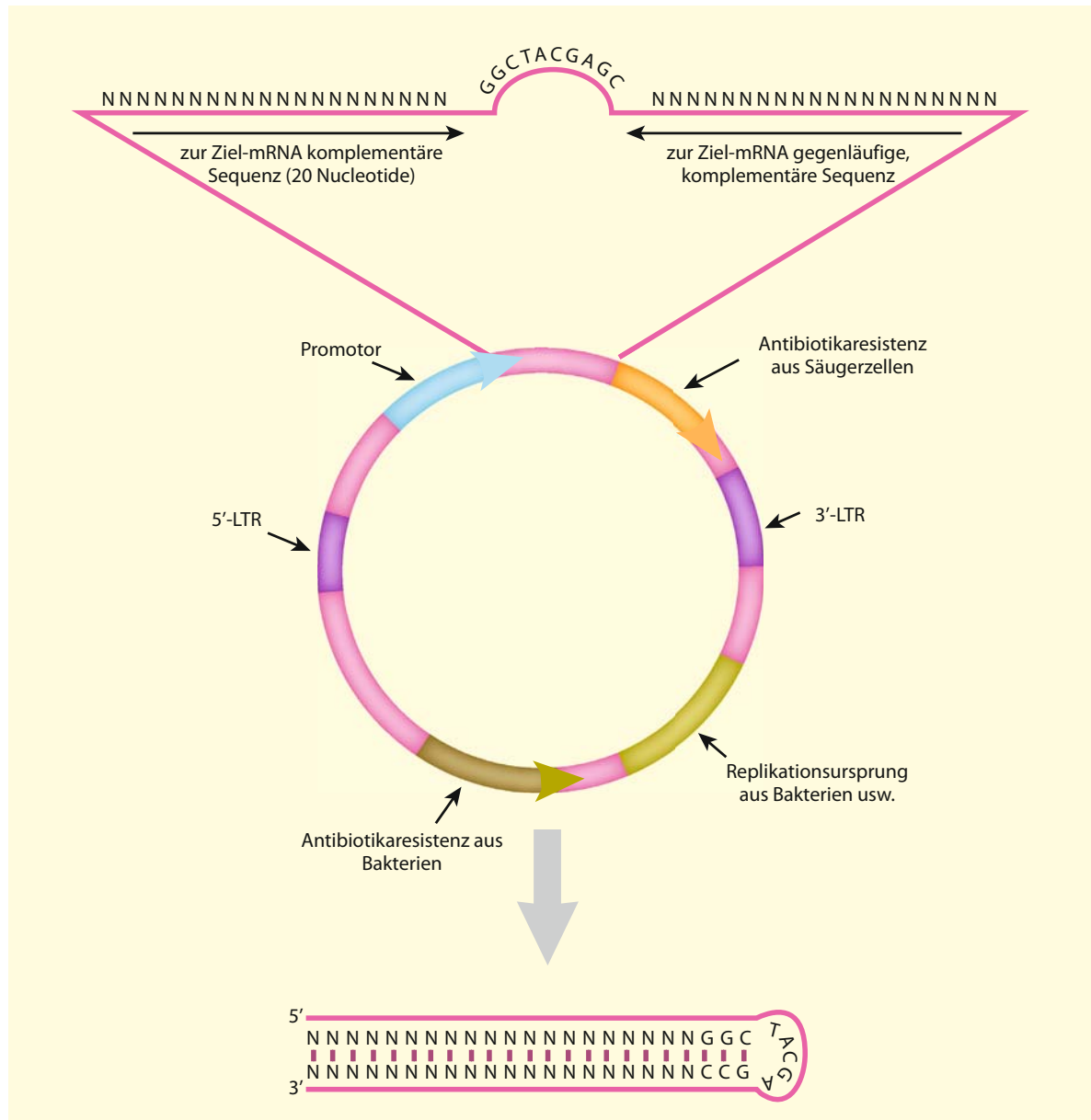
5.15 *In vitro*-Behandlung mit Dicer führt zu siRNAs

Der Schlüssel zur Herstellung von siRNAs *in vitro* ist die Klonierung des Zielgens, sodass sowohl der Sense- als auch der Antisense-Strang in mRNA transkribiert werden. Die beiden Stränge lagern sich spontan aneinander. Wird gereinigter Dicer zugegeben, entstehen kurze siRNAs.



brochen (Abb. 5.16). Bei beiden Konstrukten lagern sich die komplementären Sequenzen aneinander und bilden einen doppelsträngigen RNA-Bereich. Der am häufigsten für die *in vivo*-Expression des shRNA-Gens verwendete Promotor ist der Promotor für die RNA-Polymerase III aus Säugern. (Anmerkung: Das

Enzym transkribiert normalerweise kleine nichtcodierende RNAs). Die RNA-Polymerase III beginnt an einer spezifischen Sequenz mit der Transkription und stoppt, wenn sie auf eine Folge aus vier bis fünf Thymidinresten trifft. Die RNA-Polymerase III aktiviert nicht die Enzyme, die für das Anfügen der Cap-



5.16 Konstruktion von shRNA-Expressionsvektoren für die Aktivierung von RNAi

Vektoren lassen sich so konstruieren, dass sie verschiedene shRNA-Moleküle exprimieren. Dieser Vektor auf Basis eines Retrovirus besitzt zwei komplementäre Sequenzen mit einer Länge von etwa 20 Nucleotiden, die einen Stamm bilden, der von einer Schleifenregion unterbrochen wird. Wird eine Zelle mit diesem Vektor transformiert, dann wird die shRNA transkribiert und das Gen-Silencing aktiviert.

Struktur und des Poly(A)-Schwanzes an das Transkript verantwortlich sind. Diese Polymerase erfüllt genau die Voraussetzungen für die Synthese einer shRNA, die eine Sequenz aus eukaryotischen Zellen imitiert.

Statt mit dem Design der shRNA-Konstrukte bei Null zu beginnen verfolgt man eine Strategie, bei der bereits bestehende MikroRNA zum Einsatz kommt. Dabei wird der Stammbereich durch Sequenzen ersetzt, die zur Ziel-mRNA passen. Die neu geschaffene MikroRNA aktiviert nun RNAi für die Ziel-mRNA statt für die ursprüngliche endogene Zielsequenz.

Vektoren, die shRNAs exprimieren, haben einige Vorteile gegenüber der Zugabe von siRNA. Wird siRNA zu Säugerzellkulturen gegeben, ist die Wirkung zeitlich begrenzt. Ist die siRNA verschwunden, endet auch die Wirkung (es sei denn, die siRNA hat die Bildung von Heterochromatin ausgelöst, wie es bei manchen Organismen zu beobachten ist). Wird ein shRNA-Vektor in die Zellen übertragen, dann ist der Effekt nachhaltiger. Der Vektor produziert über eine geraume Zeit shRNA. Außerdem lässt sich die Synthese der shRNA kontrollieren, indem man induzierbare oder gewebespezifische Promotoren verwendet. Für eine klinische Anwendung ist es unbedingt erforderlich, dass die siRNA nur in solchen Geweben vorliegt, in denen sie auch aktiv werden soll, was sich durch die Verwendung eines Vektors realisieren lässt.

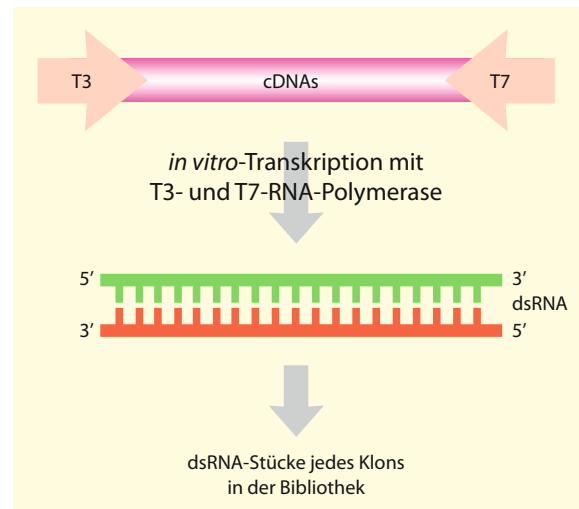
RNAi kann in Säugerzellen durch chemisch synthetisierte siRNA aktiviert werden, indem man eine shRNA herstellt, die die Ziel-mRNA abbaut. Ebenso kann man eine bestehende shRNA so verändern, dass sie eine andere Ziel-mRNA erkennt.

Funktionelles Screening mit RNAi-Bibliotheken

RNAi wurde eingesetzt, um die vollständigen Genome von Modellorganismen zu analysieren. In *E. coli* wurde eine **RNAi-Bibliothek** hergestellt, die etwa 86 % der für das Genom von *C. elegans* vorhergesagten Gene enthält. Jedes der Gene wurde als dsRNA exprimiert. *E. coli*-Zellen, die eines der Gene enthielten, dienten als Futter für *C. elegans*, wodurch RNAi des interessierenden Gens aktiviert wurde. Auf diese Weise ließ sich untersuchen, wel-

chen Effekt das Entfernen jedes möglichen Proteins aus dem Wurm hat. Durch den Einsatz dieser Bibliothek wurden mehr als 900 Gene identifiziert, deren Suppression für den Embryo letal ist oder starke Defekte bei der Entwicklung verursacht. Die meisten der von der RNAi-Bibliothek codierten Sequenzen zielten auf mRNAs, denen zuvor keine Funktion zugeordnet werden konnte. Diese Bibliotheken zeigen, wie eine Verbindung zwischen einem bestimmten Protein und einem spezifischen zellulären Prozess durch RNAi hergestellt werden kann. In *Drosophila* haben ähnliche Experimente begonnen. Eine RNAi-Bibliothek mit etwa 7200 konservierten Genen (das sind etwa 91 % der für das Genom vorhergesagten Gene) wurde hergestellt. Bislang wurde die Bibliothek benutzt, um Proteine zu identifizieren, die mit dem Zellwachstum und der Lebensfähigkeit von *Drosophila*-Zelllinien in Verbindung stehen, doch lässt sich die Bibliothek für die Untersuchung vieler anderer Prozesse einsetzen.

Um eine RNAi-Bibliothek herzustellen, wird die mRNA aus dem betreffenden Organismus extrahiert und in cDNA umgeschrieben (Abb. 5.17). Die cDNA-Klone werden mithilfe von PCR vervielfältigt (s. Kap. 4). Weil die betreffenden Genome sequenziert wurden, lassen sich für jedes Gen spe-



5.17 Herstellung einer RNAi-Bibliothek

Jeder Klon der Bibliothek muss zwei verschiedene Promotoren haben, die den codierenden Bereich flankieren. Wird der Klon in mRNA transkribiert, dann wird sowohl ein Antisense- als auch ein Sense-Transkript entstehen, und die beiden Stränge lagern sich zu einer doppelsträngigen RNA aneinander.

zifische PCR-Primer mit speziellen Eigenschaften entwickeln. Sie werden so entworfen, dass sich an den Enden jeder vervielfältigten Sequenz zwei verschiedene Promotoren befinden. So trägt das 3'-Ende z.B. einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase, das 5'-Ende dagegen den Promotor für die T3-RNA-Polymerase. Die PCR-Produkte werden anschließend in einen geeigneten Vektor kloniert. Wird dieser Vektor in eine Zelle eingeschleust, die sowohl die T7- als auch die T3-Polymerase enthält, dann wird sowohl das Sense- als auch das Antisense-Transkript synthetisiert. Die beiden Stränge lagern sich spontan aneinander und bilden so dsRNA, die RNAi aktiviert.

Für Säuger müssen RNAi-Bibliotheken mit siRNAs oder shRNAs statt mit einer vollständigen dsRNA konstruiert werden, weil die vollständigen dsRNAs toxisch sind. Diese RNAi-Bibliotheken werden mithilfe zweier unterschiedlicher Methoden hergestellt (Abb. 5.18). Bei der ersten werden für jedes Gen in der Bibliothek kurze synthetische siRNAs hergestellt. Alle siRNAs werden gemischt und in einen geeigneten Vektor kloniert. Der Vektor muss über Promotoren und Terminatoren verfügen, um die siRNA-Sequenzen in Form doppelsträngiger RNAs zu ex-

primieren. Die Promotoren sind in der Regel zwei RNA-Polymerase-Promotoren, von denen ausgehend Sense- und Antisense-Stränge der klonierten Fremd-DNA synthetisiert werden. Wie bereits beschrieben, lagern sich diese Stränge spontan aneinander, und es entsteht siRNA. Der Vektor muss außerdem andere geeignete Sequenzen enthalten, wie einen Replikationsursprung aus Säugern und Bakterien sowie Gene für Antibiotikaresistenz zur Selektion der Zellen, die den Vektor enthalten.

Bei dem zweiten Verfahren für die Konstruktion einer Säuger-RNAi-Bibliothek werden Restriktionsenzyme verwendet, um kurze shRNA-Fragmente herzustellen. Bibliotheken aus **restriktionsenzymgenerierter siRNA (REGS)** gehen entweder von einem einzelnen oder von vielen Genen aus, die später in der Bibliothek repräsentiert sein sollen (s. Abb. 5.18b). Unabhängig davon, ob eine große oder eine kleine Probe von Genen verwendet wird, beginnt die Herstellung mit doppelsträngigen cDNAs. Die Sequenzen werden mit häufig schneidenden Restriktionsenzymen, die identische Überhänge hinterlassen, gespalten. Dadurch entstehen von jedem Gen viele verschiedene kurze Fragmente. Da jedes der Fragmente eine andere Größe hat, müssen sie auf dieselbe

Exkurs 5.1

Schützt RNAi Säugerzellen vor Virusinfektionen?

Es ist allgemein anerkannt, dass Pflanzen RNAi nutzen, um sich vor einer Infektion durch Viren zu schützen. Man konnte zeigen, dass siRNAs aus Viren entstehen, wenn die Pflanze mit DNA- oder RNA-Viren infiziert wurde. Pflanzen, die in verschiedenen Komponenten von RNAi Mutationen aufweisen, sind anfälliger für Virusinfektionen. Pflanzen verfügen auch über ein System zur Ausbreitung des RNAi-Signals in nichtinfizierte Bereiche des Pflanzenkörpers, wodurch benachbartes Gewebe geschützt wird. Und nicht zuletzt besitzen Pflanzenviren auch Gene bzw. Proteine, die RNAi supprimieren.

In Säugerzellen gibt es nur wenige Hinweise darauf, dass RNAi den Organismus vor Viren schützt. Wird ein Säuger von Viren infiziert, dann schützen das angeborene und das adaptive Immunsystem den Organismus sehr effizient. Zunächst werden zelluläre Proteine wie der *toll like*-Rezeptor, Proteinkinase R und das retinolsäureinduzierbare Gen I durch den Eintritt des Virus in die Zelle aktiviert. Diese setzen die Transkription und die Translation vieler verschiedener Gene, hauptsächlich von Typ-I-Interferonen und unspezifischen RNasen, in Gang. Diese Proteine arbeiten bei der Bekämpfung der Infektion zusammen. Die Abwehrsysteme von Säugern beruhen

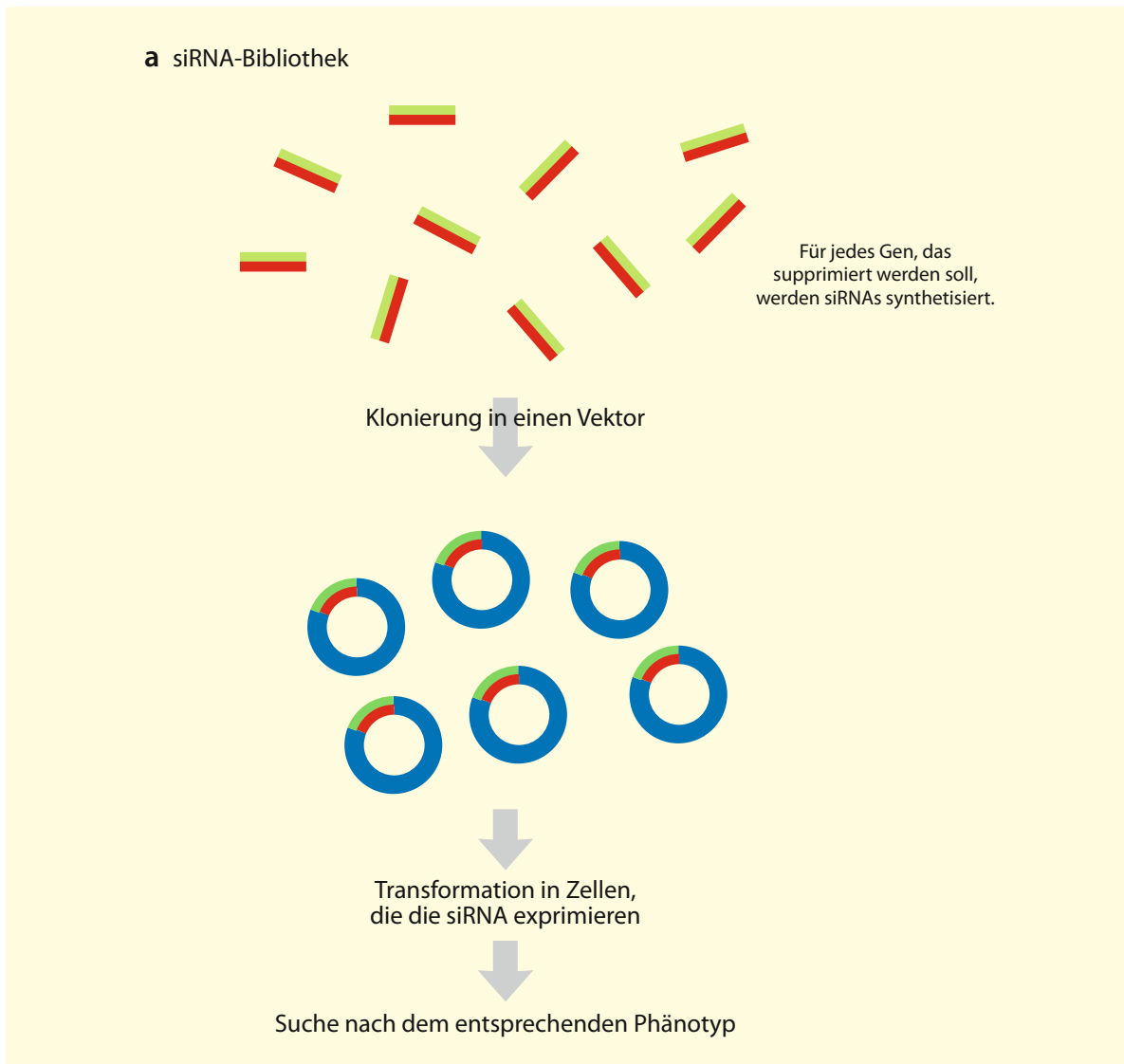
möglicherweise auch deshalb nicht auf RNAi, weil sie nur ein Gen für ein Dicerhomolog besitzen. (Im Gegensatz zu *Arabidopsis*, wo vier verschiedene Dicerhomologe vorkommen.) Säugerzellen verbreiten auch kein RNAi-Signal, das sich in nichtinfizierte Gewebe ausbreitet, wie es bei Pflanzen der Fall ist.

Kürzlich erhielt man jedoch Hinweise auf RNAi zur Abwehr eines Virusbefalls in Säugerzellen. Einige Proteine aus säugerspezifischen Viren haben RNAi-Proteine zum Ziel. So bindet z.B. NS1 aus dem Grippevirus *in vitro* an siRNA und supprimiert das RNA-Silencing, wenn es in Pflanzen exprimiert wird. Außerdem konnte man zeigen, dass ein weiteres Virusprotein, tat aus HIV, gereinigten Dicer *in vitro* hemmt. Bislang gibt es nur wenige Hinweise, doch die Experimente, die siRNA und plasmidcodierte shRNA nutzen, um Virusinfektionen von Säugerzellen zu hemmen, sind überzeugend. In vielen Studien zeigte sich, dass das Einbringen von siRNA oder shRNA in Tierrmodellorganismen die Replikation der Viren reduzierte und den Organismus vor tödlichen Infektionen bewahrte. Ob Säugerzellen RNAi nun als primäre Verteidigung gegen Viren nutzen oder nicht, so schützt die Aktivierung dieses Systems doch vor Virenangriffen.

Größe zurechtgeschnitten werden. Dafür wird das 3'-Ende der Fragmente mit einer Haarnadelstruktur gekoppelt, die eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *MmeI* enthält. Das Enzym schneidet exakt 20 Nucleotide von dem 3'-Ende seiner Erkennungssequenz entfernt, sodass jedes Fragment anschließend dieselbe Größe besitzt.

Um von diesen zufälligen Konstrukten viele siRNA-Kopien herzustellen, werden die Konstrukte in doppelsträngige Schleifen umgewandelt. Zunächst wird

an das *MmeI*-geschnittene 5'-Ende eine zweite Haarnadelstruktur ligiert. Eine virale DNA-Polymerase (aus $\phi 29$) wandelt nun die Schleife in dsDNA um. Diese Polymerase trennt die Stränge in doppelsträngigen Bereichen und synthetisiert für den gesamten Ring einen zweiten Strang. Nachdem die $\phi 29$ -DNA-Polymerase die dsDNA ersetzt hat, fährt sie Runde um Runde mit der Synthese fort, und für jede Schleife entsteht ein langes Concatemer wie bei der *rolling circle*-Replikation. Das Concatemer wird mit *BglII* und

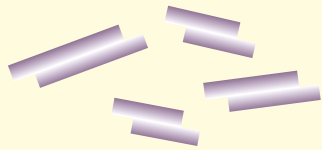


5.18 Herstellung von siRNA- oder shRNA-Bibliotheken

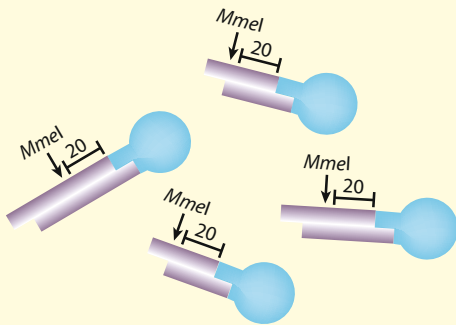
a Chemisch synthetisierte Oligonucleotide werden in einen Vektor kloniert, der Promotoren für die Expression beider mRNA-Stränge enthält. Nach der Transkription lagern sich die beiden Stränge aneinander und bilden eine siRNA.

b mithilfe von Restriktionsenzymen hergestellte siRNA

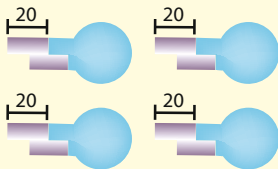
Spaltung der interessierenden Gene mit Restriktionsenzymen



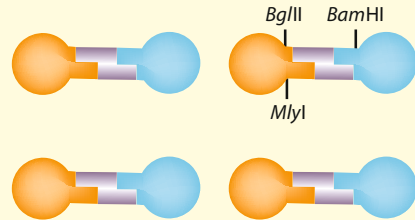
Ligation der 3'-Haarnadel an das Fragment



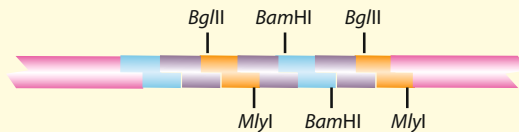
Schneiden mit *MmeI*, sodass jede Stammregion eine Länge von 20 Nucleotiden hat



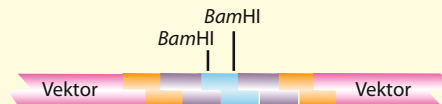
Addition der 5'-Haarnadel



rolling circle-Replikation



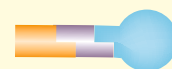
Schneiden mit *BglII* und *MlyI* und Klonierung in einen Vektor



Schneiden mit *BamHI*, um die Schleife zu verkleinern



Expression

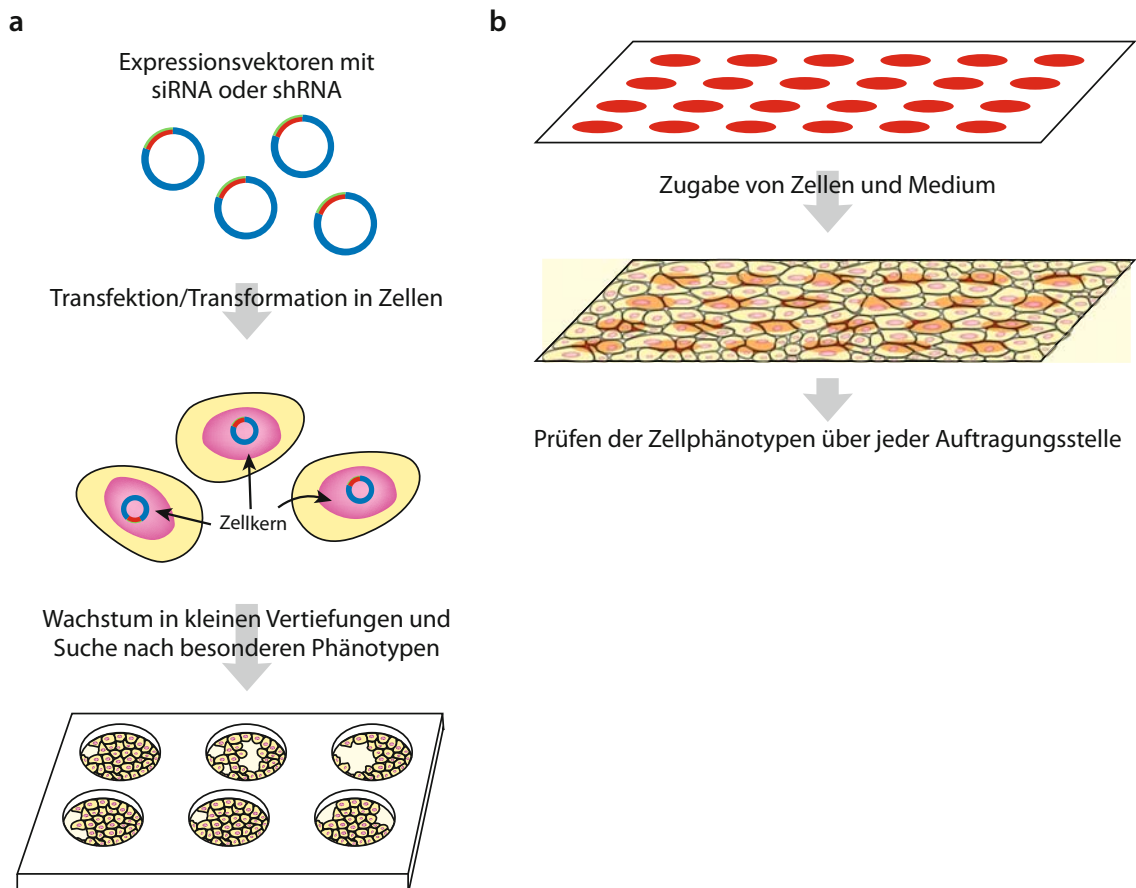


5.18 Fortsetzung

b Restriktionsenzymgenerierte siRNA (REGS) bildet eine Bibliothek aus kurzen Haarnadel-RNAs (shRNAs). Zunächst werden die interessierenden Gene an beliebiger Stelle mit Restriktionsenzymen gespalten. Nun wird an das 3'-Ende der Fragmente eine Haarnadelstruktur ligiert. *MmeI* schneidet die Fragmente, sodass sie eine einheitliche Länge besitzen. *MmeI* ist ein Typ-I-Restriktionsenzym, dessen Erkennungsstelle sich in der 3'-Haarnadelstruktur befindet und dessen Schnittstelle 20 Nucleotide weiter im Restriktionsfragment liegt. Die Fragmente werden anschließend am 5'-Ende mit einer Haarnadelstruktur versehen und einer *rolling circle*-Replikation unterworfen, um eine kurze, haarnadelcodierende Region zu schaffen. Das replizierte lineare Fragment besitzt sich wiederholende Segmente aus 5'-Haarnadel (orange), kloniertem Fragment (grau), 3'-Haarnadel (blau), kloniertem Fragment (grau), 5'-Haarnadel (orange) usw. Als nächstes wird das Fragment mit Restriktionsenzymen geschnitten, die nur die 5'-Haarnadel (orange) erkennen. Das entstehende Stück besitzt zwei komplementäre Sequenzen (orange und grau), die durch eine Schleife (blau) getrennt sind. Wird dieses kloniert und in mRNA transkribiert, dann lagern sich die beiden komplementären Sequenzen (orange und blau) aneinander und bilden eine kleine Haarnadelstruktur.

MylI gespalten, um zwei komplementäre Genfragmente zu erhalten, die durch die 3'-Schleife miteinander verbunden sind. Diese 3'-Schleife wird durch eine Spaltung mit *Bam*HI verkürzt, und die beiden Fragmente werden ligiert. Das Endprodukt wird in einen Vektor kloniert und die klonierte Fremd-DNA in eine einzelsträngige RNA transkribiert. Schließlich bilden die komplementären Sequenzen Basenpaarungen und eine kleine Haarnadelstruktur aus, und Dicer prozessiert die Strukturen zu siRNA.

Die RNAi-Bibliotheken lassen sich entweder in *multiwell*-Platten oder *live cell-Microarrays* analysieren (Abb. 5.19). Die *multiwell*-Platten verwenden eine **Barcodesequenz** in der shRNA, mit deren Hilfe sich feststellen lässt, welcher Klon welchem Gen entspricht. Eine Barcode- oder Zipcodesequenz ist etwa 20 Nucleotide lang und für jeden Klon einzigartig. Jeder Klon lässt sich anhand dieser Sequenz identifizieren, und es ist nicht notwendig, das eingebaute Gen vollständig zu sequenzieren.



5.19 Multiwell-Platten-Assay und *live cell*-Microarrays

a Bibliotheken aus kurzen interferierenden RNAs (siRNAs) und kurzen Haarnadel-RNAs (shRNAs) können die Funktion von Säugerproteinen entschlüsseln. Werden Säugerzellen mit der Bibliothek transfiziert, dann lässt sich jede Zelle auf ihren physikalischen Phänotyp hin untersuchen, wie der Verlust der Adhärenz, Unterbrechung der Mitose oder eine veränderte Zellform. Die shRNAs oder siRNAs, die einen interessanten Phänotyp hervorrufen, lassen sich isolieren und sequenzieren, um das supprimierte Gen zu ermitteln. **b** Statt Zellen zu transformieren können siRNA- oder shRNA-Sequenzen auch auf einen Objektträger aufgetropft werden. Wachsen und teilen sich Zellen auf dem Träger, dann werden die siRNAs von den Zellen aufgenommen und aktivieren RNAi. Die Zellen über den Stellen mit einer punktförmigen Auftragung können auf einen besonderen Phänotyp hin untersucht werden.

Um die Bibliothek zu untersuchen, wird eine große Anzahl von Zellen transformiert, mit denen anschließend das Medium in den Vertiefungen (engl. *wells*) einer *multiwell*-Platte angeimpft wird. In jede Vertiefung wird eine festgelegte Zahl von Zellen eingebracht, die alle Klone einer Zelle sind und nur einen Typ von siRNA enthalten. Die Zellen werden anschließend auf Symptome untersucht. Bei den Zellen mit sichtbaren Symptomen wird die enthaltene siRNA durch die Barcodesequenz identifiziert. Eine weitere Methode für das Screening einer siRNA- oder shRNA-Bibliothek ist das punktförmige Auftragen jedes Klons auf einen Glasträger in einem Microarray (s. Kap. 8). Anschließend überschichtet man die Punkte mit lebenden Zellen, die die siRNA oder die shRNA aufnehmen. Die Veränderung eines Zellphänotyps über einer Stelle, an der die RNA aufgetragen wurde, geht auf eine bestimmte siRNA zurück.

Wird jedes Protein eines Genoms hinsichtlich eines abweichenden Phänotyps, verursacht durch RNAi, untersucht, dann lässt sich ein **Phänotypkatalog** herstellen. So arretieren z.B. viele Gene/Proteine, die an der Aufteilung der Zellmembran beteiligt sind, die Zellen während der Zellteilung in einer Brückenstruktur. Ein unbekanntes Protein, das in einem RNAi-Screening denselben Phänotyp verursacht, ist möglicherweise ein Mitglied derselben Proteinfamilie. Diese Proteine haben dieselbe **Phänotypsignatur**. Auf diese Weise wurden Datenbanken für *C. elegans* (<http://nematode.bio.nyu.edu:8001>) und *Drosophila* (<http://www.flyRNAi.org>) erstellt, in denen diese Art von Information gesammelt wird, um sie anderen Wissenschaftlern zugänglich zu machen.

RNAi-Bibliotheken werden verwendet, um die Funktion eines unbekannten Proteins zu ermitteln, indem die gesamte zelluläre mRNA für das Protein abgebaut wird. Jeder Klon der Bibliothek zielt dabei auf ein Protein.

RNAi-Bibliotheken werden hergestellt, indem chemisch synthetisierte siRNA-Sequenzen in einen Vektor kloniert werden, der diese Fremd-DNA in dsRNA transkribiert.

Auch lassen sich Restriktionsenzyme einsetzen, um synthetische, kurze Haarnadel-RNAs zu konstruieren. Diese können ebenfalls in eine Bibliothek eingebaut werden.

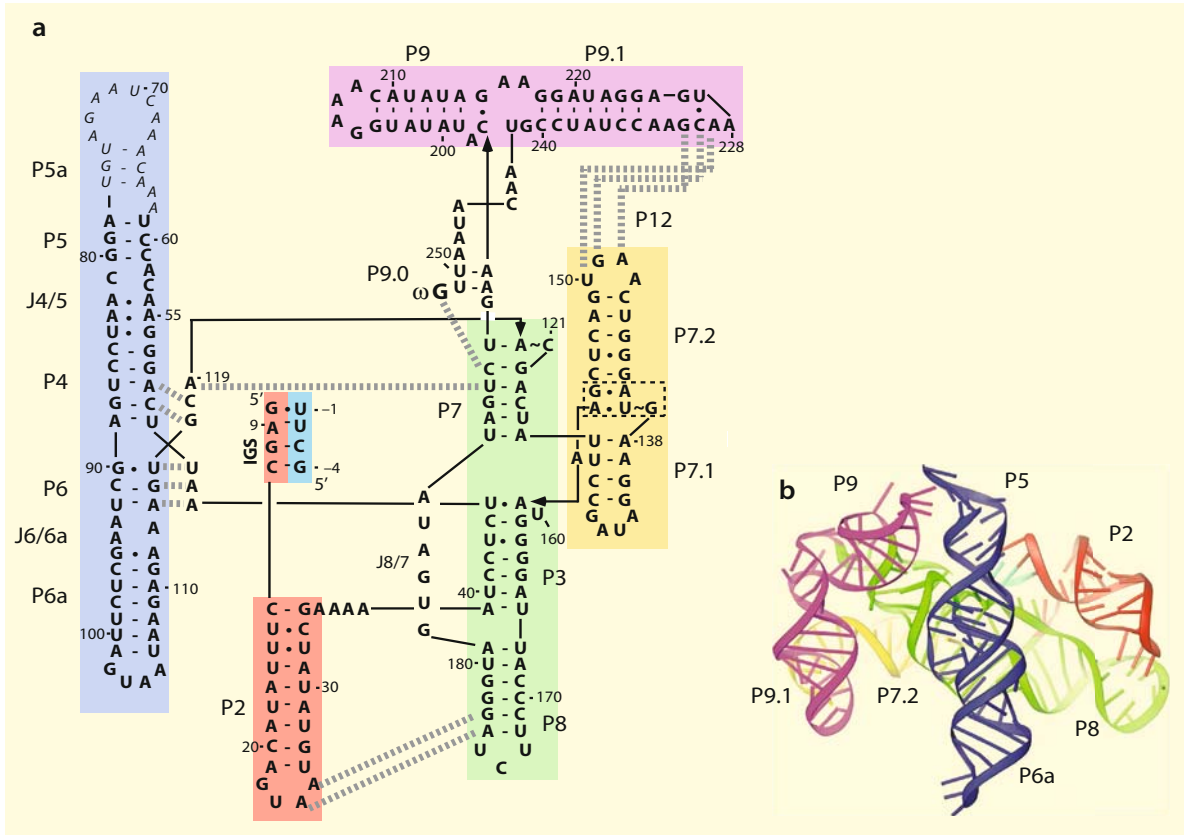
Säugerzellen können mithilfe eines *live cell*-Microarrays oder eines Assays mit *multiwell*-Platten nach Mutationen durchsucht werden, die durch einen Klon der RNAi-Bibliothek induziert wurden.

Ribozyme katalysieren Spaltungs- und Ligationsreaktionen

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die an spezifische Zielmoleküle binden und enzymatische Reaktionen katalysieren. Sie bestehen aus RNA, die zwar manchmal mit Proteinen assoziiert ist, doch der tatsächliche Katalysator der Reaktion ist die RNA. Einige Ribozyme funktionieren wie allosterische Enzyme, d.h. die Bindung eines Effektormoleküls verändert die Struktur des Ribozyms, sodass ein Substrat gespalten wird. Ribozyme sind natürlich vorkommende Moleküle, und die biotechnologische Forschung hat bereits damit begonnen, ihre einzigartigen Eigenschaften für medizinische und industrielle Anwendungen zu nutzen.

Zurzeit teilt man Ribozyme in acht Klassen ein, doch es gilt als sicher, dass noch viele weitere entdeckt werden. Es gibt große und kleine Moleküle. Die großen haben eine Länge von mehreren Hundert bis zu 3000 Nucleotiden. Es waren die ersten Ribozyme, die man entdeckte, und von diesen waren die ersten Gruppe-I-Introns von *Tetrahymena*. Bei diesen Ribozymen handelt es sich um Intronsequenzen, die in Prä-mRNA vorkommen, die sich selbst spleißen kann. Für diesen Vorgang sind keine Spleißfaktoren wie U1-, U2-, U4/U6-snRNA (auch als *snurps* bezeichnet) notwendig. Gruppe-I-Introns sind häufig in pilzlichen und pflanzlichen Mitochondrien, in rRNA-Genen des Zellkerns, in Chloroplasten-DNA, in Bakteriophagen, eukaryotischen Viren und in der tRNA aus Chloroplasten und Eubakterien. Ein wichtiger Faktor bei der Selbstspaltung eines Introns ist die RNA-Struktur. RNA ist ein lineares Polymer, doch aufgrund von Basenpaarungen zwischen verschiedenen Regionen, besitzt RNA auch eine Sekundärstruktur. Viele Stamm-Schleife-Strukturen falten sich zu verschiedenen Konfigurationen, die wiederum eine dreidimensionale Struktur ergeben, ähnlich wie die eines Proteins (Abb. 5.20). Das gezeigte Beispiel ist das zweite Gruppe-I-Intron innerhalb des *orf142*-Gens aus dem Bakteriophagen Twort, der *Staphylococcus aureus* infiziert. Die dreidimensionale Struktur des Gruppe-I-Introns sorgt für eine enge Nachbarschaft zwischen den beiden Exons und erleichtert so die Entfernung des dazwischen liegenden Introns (Abb. 5.21).

Gruppe-II-Introns sind ebenfalls selbstspleißende Sequenzen, die sich innerhalb von Genen befinden. Sie sind seltener als Gruppe-I-Introns und kommen



5.20 Struktur des Twort-Ribozyms

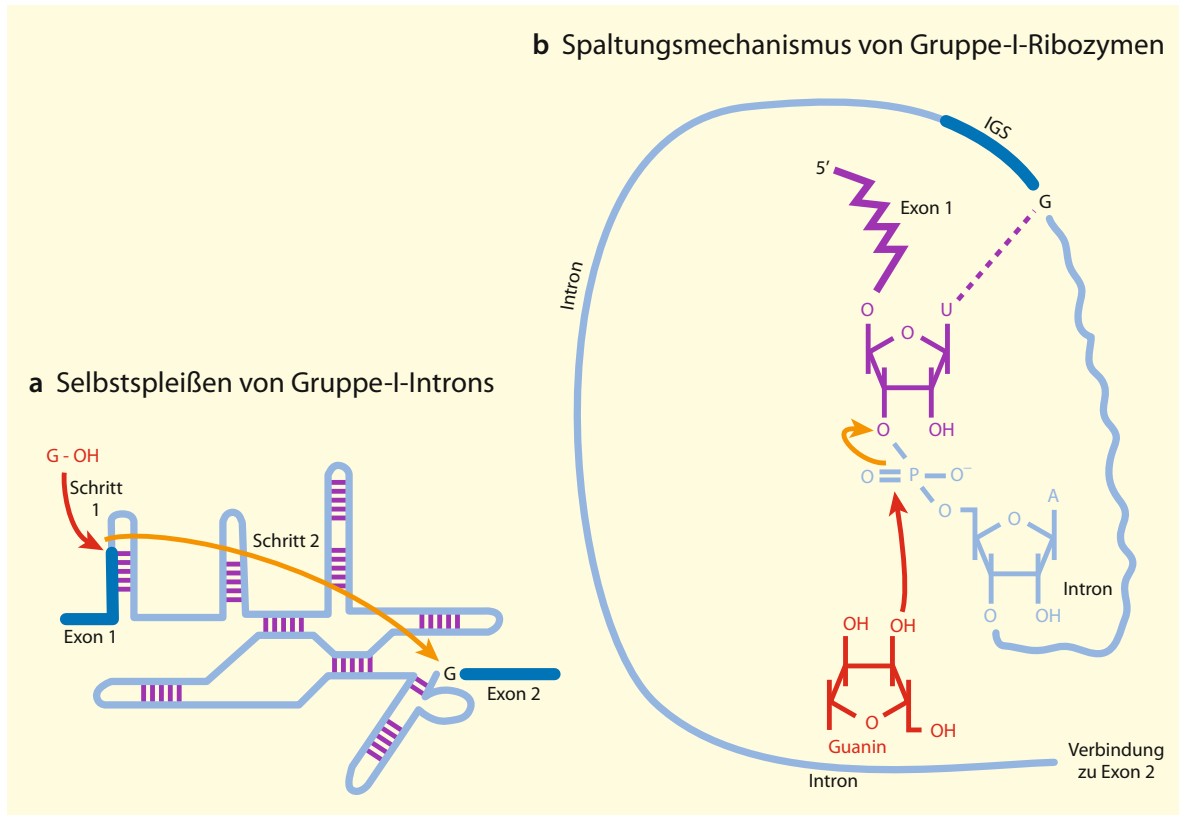
a Primär- und Sekundärstruktur des Wildtypintrons. Die P1-P2-Domäne ist rot hervorgehoben, die P3-P7-Region grün, die P4-P6-Domäne blau, die P9-P9.1-Region violett, die P7.1-P7.2-Subdomäne gelb und das Oligonucleotidprodukt blaugrün. Gestrichelte Linien zeigen die wichtigsten Kontakte der Tertiärstruktur an. Kursiv geschriebene Nucleotide (P5a-Region) liegen im Kristall ungeordnet vor. IGS, interne *guide*-Sequenz. **b** Bänderdiagramm (die Farben sind wie in **a** zugeordnet). Das Rückgrat ist durch die Positionen der Phosphate angezeigt. Aus: Golden, Kim und Chase (2004) Crystal structure of a phage Twort group I ribozyme-product complex. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von: Macmillan Publishers Ltd. *Nat Struct Mol Biol* 12: 82–89, copyright 2005.

nur in pilzlichen und pflanzlichen Mitochondrien, pflanzlichen Chloroplasten, Algen, Eubakterien und in Chloroplasten von *Euglena gracilis* vor. Diese Introns spleißen sich *in vitro* nicht selbst und erfordern für ihre Aktivität Bedingungen, die stark von den physiologischen Bedingungen abweichen. Die dreidimensionale Struktur des Introns sorgt *in vivo* für diese anormalen Bedingungen, indem sie die Mikroumgebung beeinflusst und die notwendige Ionenkonzentration einstellt. Die Struktur von Gruppe-II-Introns bringt zwei Exons in enge Nachbarschaft und erleichtert so die Entfernung des Introns und die Ligation der Exons (Abb. 5.22).

Ein weiteres, natürlich vorkommendes großes Ribozym ist RNase P aus Bakterien. Dabei handelt

es sich um einen RNA-Protein-Komplex, bei dem die RNA-Komponente die katalytisch aktive Einheit darstellt. RNase P schneidet das 5'-Ende von Prä-tRNA-Molekülen. Die Substrate von RNase P sind im Gegensatz zu denen von Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns, die nur sich selbst spalten, unterschiedlich.

Ribozyme sind natürlich vorkommende RNAs, die eine enzymatische Reaktion katalysieren. Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns sind zwei Typen von Ribozymen, die das Phosphatrückgrat spalten und sich selbst aus dem mRNA-Molekül schneiden können, ohne weitere zelluläre Enzyme zu benötigen.



5.21 Mechanismus der Selbstsplicingreaktion von Gruppe-I-Introns

a Die Sekundärstruktur von Gruppe-I-Introns zeigt viele Haarnadelstrukturen, die die Spaltungsreaktion vermitteln. In Schritt 1 vermittelt ein freies Guanosin (rot, G-OH) die Spaltung der Grenze zwischen Exon 1 und Intron. In Schritt 2 schneidet und ligiert das freie Ende von Exon 1 an Exon 2. **b** Mechanismus der Spaltung durch das Gruppe-I-Ribozym. Zuerst werden die Exonsequenzen über interne *guide*-Sequenzen (IGS) in die Nähe des katalytischen Kerns verlagert. Exon 1 besitzt ein wichtiges Uridin (U), das mit der IGS ein U=G-Basenpaar bildet (gestrichelte Linie). Das andere Ende des Ribozyms trägt eine Bindungsstelle für das Nucleophil, ein freies Guanosin (rot), das die Entfernung des Introns einleitet, indem es das Ende von Exon 1 mit dem 3'-OH seiner Ribose angreift. Das freie 3'-OH-Ende des Exons reagiert dann mit der Spleißstelle in Exon 2. Das Intron wird herausgespleißt und die beiden Exons werden miteinander verbunden (nicht dargestellt). Obwohl man annehmen könnte, dass diese Reaktion Energie verbraucht, bleibt die Zahl der Bindungen immer gleich und es ist keine Zufuhr von Energie erforderlich.

Kleine, natürlich vorkommende Ribozyme

Im Gegensatz zu den großen Ribozymen sind kleine Ribozyme nur etwa 200 bis 500 Nucleotide lang. Zu diesen Molekülen gehören Hammerkopf- und Haarnadelribozyme, das Ribozym aus dem Hepatitis-D-Virus und das Varkud-Satellitenribozym. Sie sind häufig in Viroiden, Virusoiden und Satellitenviren zu finden, die **subvirale Agenzien** darstellen. Viroide sind selbstreplizierende Pflanzenpathogene, die aus

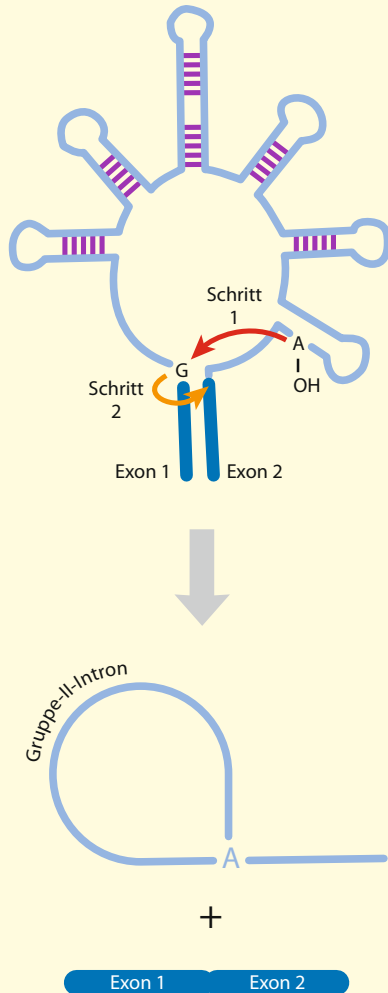
nahezu nackter einzelsträngiger RNA ohne Proteinhülle bestehen. Satellitenviren sind kleine RNA-Moleküle, die entweder für die Replikation oder die Capsidbildung einen Helferviren benötigen. Ihre Genome können Proteine codieren. Virusoiden sind sogar noch weniger funktionsfähig und werden häufig als Subtyp von Satellitenviren betrachtet. Virusoiden sind einzelne Stränge zirkulärer RNA, die keine Proteine codieren. Sie benötigen sowohl für die Replikation als auch für die Bildung einer Proteinhülle Helferviren.

Ein **Hammerkopfribozym** ist eine kleine katalytische RNA, die eine Selbstspaltungsreaktion zu kata-

lysieren vermag. Hammerkopfribozyme sind an der Replikation einiger Viroide und Satelliten-RNAs beteiligt (Abb. 5.23). Beide haben einzelsträngige RNA-Genome mit einer stäbchenartigen Struktur, welche nicht von zellulären Ribonucleasen angegriffen wird.

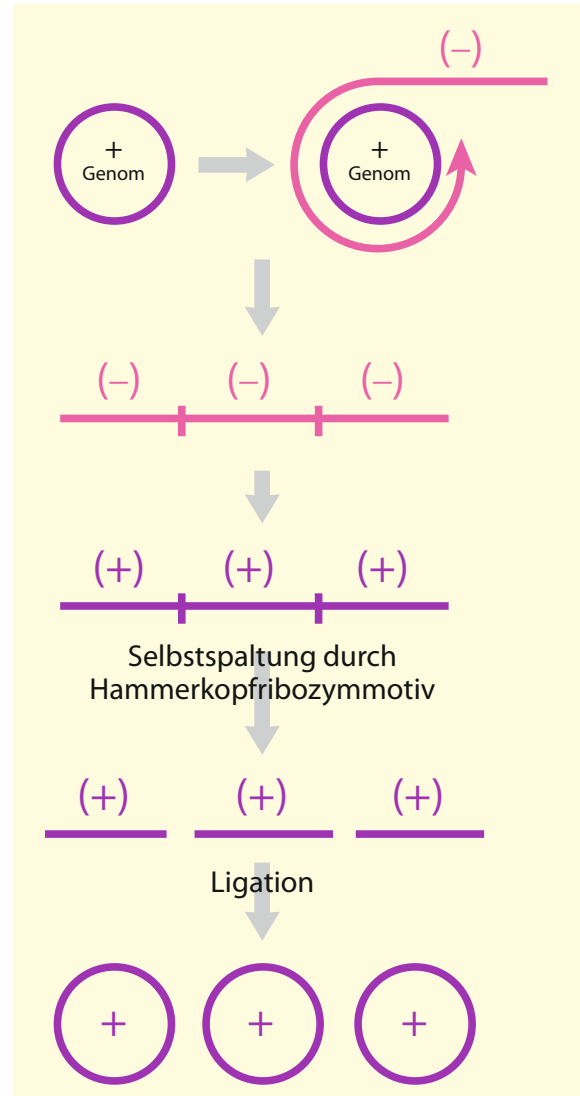
Bei der Viroidreplikation wird der positive RNA-Strang durch die RNA-Polymerase der Wirtszelle repliziert, sodass ein langes Concatemer aus Genomen mit negativem RNA-Strang entsteht. Dieses Concatemer dient nun der RNA-Polymerase als Matrice für

Selbstspleißen von Gruppe-II-Introns



5.22 Spleißreaktionen von Gruppe-II-Introns

Durch die Sekundär- und Tertiärstruktur von Gruppe-II-Introns gelangen die beiden Exons in enge Nachbarschaft, der Reaktionsmechanismus erfordert kein externes Nucleophil. Dessen Rolle übernimmt die 2'-OH-Gruppe eines internen, hochkonservierten Adeninrestes. Diese Gruppe greift die 5'-Spleißstelle an und spaltet das Phosphatrückgrat. Das 3'-OH an der 5'-Spleißstelle greift die 3'-Spleißstelle an, wodurch zwei miteinander ligierte Exons entstehen. Das Intron bildet eine Lasso-(Lariat)-struktur.



5.23 Lebenszyklus von Viroiden

Viroide sind einzelsträngige, zirkuläre RNA-Genome ohne Proteinhülle, doch mit einer Fähigkeit zur Selbstreplikation. Zunächst wird das (+)-Strang-Genom über die *rolling circle*-Replikation in ein Concatemer aus (-)-Strang-Genomen umgewandelt. RNA-Polymerasen wandeln die (-)-Strang-Genome in (+)-Strang-Genome um, die getrennt und ligiert werden, sodass zirkuläre Genome entstehen. Die Hammerkopfribozyme, die in das Genom des Viroids integriert sind, katalysieren Trennung und Ligation.

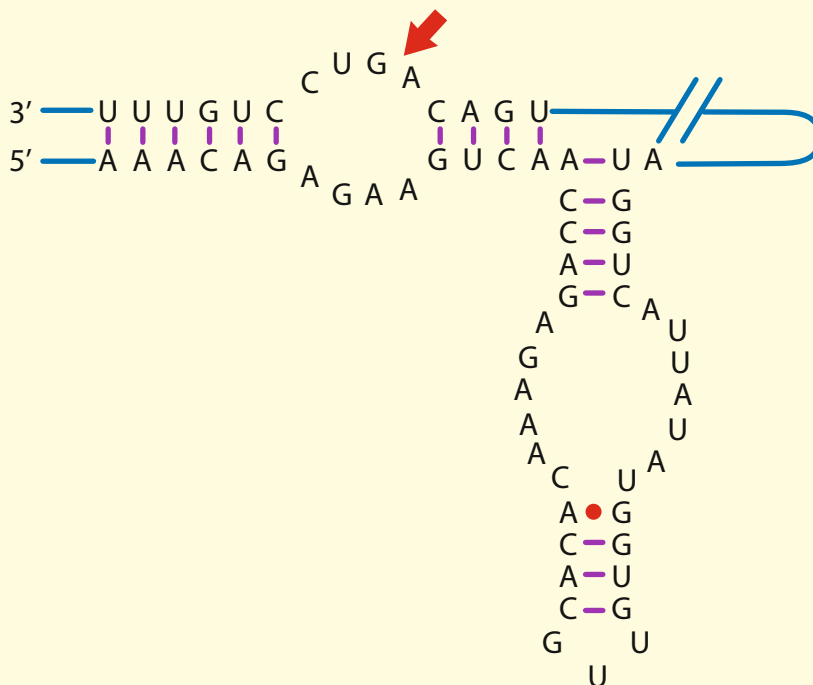
die Synthese des positiven Stranges. Die lange RNA wird durch das Hammerkopfmotiv zu einzelnen, einheitlichen Genomen zerschnitten. Hammerkopfribozyme schneiden zunächst das Ribose-Phosphat-Rückgrat der RNA und ligieren anschließend die linearen Genome, sodass Ringe entstehen.

Ein weiteres kleines Ribozym ist das **Haarnadelribozym** (Abb. 5.24). Es kommt in pflanzenpathogenen Satellitenviren wie dem Tabakringfleckenvirus vor. Das Haarnadelribozym aus dem Virus wurde ursprünglich als „Büroklammerribozym“ bezeichnet, was die Struktur möglicherweise besser beschreibt. *In vivo* spalten Haarnadelribozyme die linearen Concatemere einzelsträngiger DNA-Genome, ähnlich wie Hammerkopfribozyme, sie ligieren anschließend die linearen Abschnitte zu zirkulären Genomen.

Zwei weitere kleine Ribozyme sind das **Varkud-Satellitenribozym** aus *Neurospora* und das **Hepatitis-D-Virus** (HDV), das Menschen infiziert. Beide funktionieren nach einem ähnlichen Reaktionsmechanismus, um die Selbstspaltung und die Ligationsreaktion zu initiieren. Das Varkud-Satellitenribozym unterstützt die Replikation des kleinen Varkud-Plasmids, das in Mitochondrien von *Neurospora* vorkommt. Das Hepatitis-D-Virus ist ein viroidähnliches Satellitenvirus des Hepatitis-B-Virus.

Das Hepatitis-B-Virus infiziert die Leber und kann Leberzirrhose und Leberschädigungen verursachen und gelegentlich zum Tod führen. In Patienten mit Hepatitis B verstärkt HDV die Symptome, wodurch die Erkrankung oft sehr schwer verläuft. Das Satellitenvirus HDV besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom, das in Leberzellen sowohl in der positiven als auch in der negativen Form vorkommt. Die genomischen und die antigenomischen Sequenzen, wie die Bezeichnungen der beiden Formen lauten, besitzen Bereiche, die zu einem aktiven Ribozym gefaltet sind und die die Spaltung und die Ligation der RNA katalysieren. Im Gegensatz zu pflanzlichen Viroiden besitzt HDV ein offenes Leseraster, das ein Protein namens δ -Antigen codiert. Dieses Protein ist zusammen mit den Hüllproteinen des Hepatitis-B-Virus für die Verpackung von HDV in kleine runde Partikel verantwortlich. Diese können sich von Zelle zu Zelle und über Körperflüssigkeiten wie Speichel und Sperma auch von Mensch zu Mensch ausbreiten.

Kleine, natürlich vorkommende Ribozyme sind in subviralen Agenzien wie Viroiden und Satellitenviren zu finden. Sie haben gemeinsame Motive, die die RNA-Spaltung katalysieren.



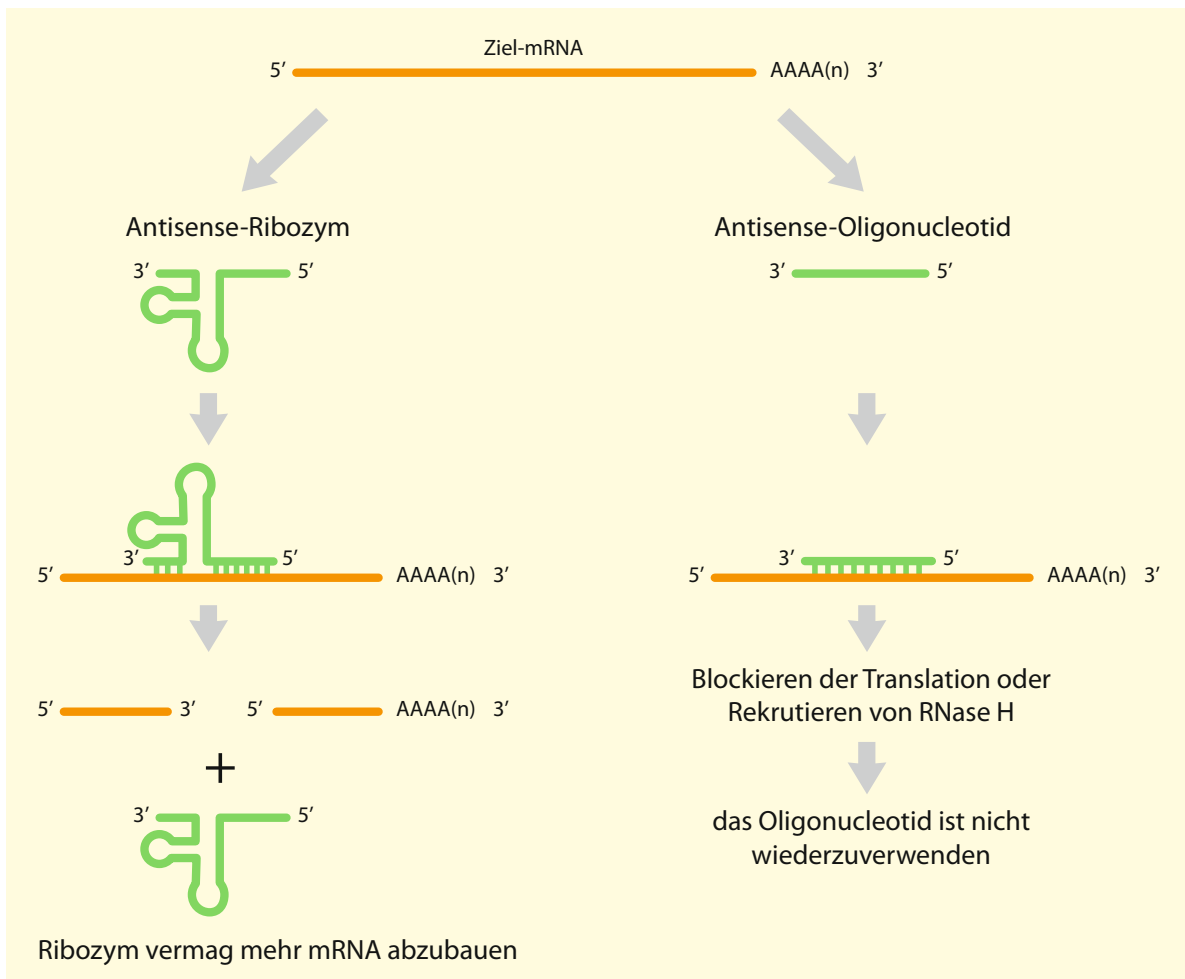
5.24 Sekundärstruktur eines Haarnadelribozyms

Dargestellt ist der (-)-Strang des Genoms des Tabakringfleckenvirus. Die Schnittstelle ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Die gentechnische Veränderung von Ribozymen für medizinische und biotechnologische Anwendungen

Gentechnisch veränderte Ribozyme werden eingesetzt, um die Expression von Genen zu supprimieren, insbesondere von solchen, die das Wachstum von Krebszellen oder von humanpathogenen Viren wie HIV fördern. Um ein solches Molekül herzu-

stellen, wird das katalytische Zentrum mit einer Region kombiniert, die das Zielgen erkennt. Die Konstruktion der Erkennungsregion erfolgt häufig unter Anwendung der Antisense-Technologie. Es werden hier also zwei Verfahren miteinander verknüpft (Abb. 5.25). Zuerst wird eine geeignete Region auf der Ziel-mRNA ausgewählt. Diese Region darf nur sehr wenige Sekundärstrukturen und keine Bindungsstellen für Proteine besitzen. Als nächstes wird eine Antisense-RNA synthetisiert, die zur Ziel-mRNA passt. Diese Antisense-Sequenz ist unterteilt: Die 5'-Hälfte liegt vor dem katalytischen Zentrum des Ribozyms und die 3'-Hälfte dahinter. Wird dieses chimäre Ribozym mit der Ziel-mRNA gemischt,



5.25 Ein Antisense-Konstrukt mit einem Ribozym inaktiviert die Ziel-mRNA

Das chimäre Antisense-Ribozym bindet nicht nur an eine spezifische Ziel-mRNA, sondern schneidet diese auch. Ein herkömmliches Antisense-Oligonucleotid muss RNase H rekrutieren, um die Ziel-mRNA zu spalten. Außerdem schneidet RNase H auch das Oligonucleotid, das daher nicht weiter verwendet werden kann.

an Kügelchen oder durch Bindung an Biotin immobilisiert werden. Die bindenden Sequenzen lassen sich direkt ermitteln oder sie können vereinigt und wiederholten Selektionszyklen unterworfen werden. Dadurch lassen sich die Sequenzen aussortieren, die unspezifisch gebunden haben. Um neue bindende Substrate zu identifizieren, muss man die RNA von dem Ribozym lösen und anschließend mithilfe eines 3'-Primers und den entsprechenden Enzymen in cDNA transkribieren. Da die Zahl der spezifisch bindenden Moleküle gering ist, werden diese vor der Sequenzierung durch PCR vervielfältigt.

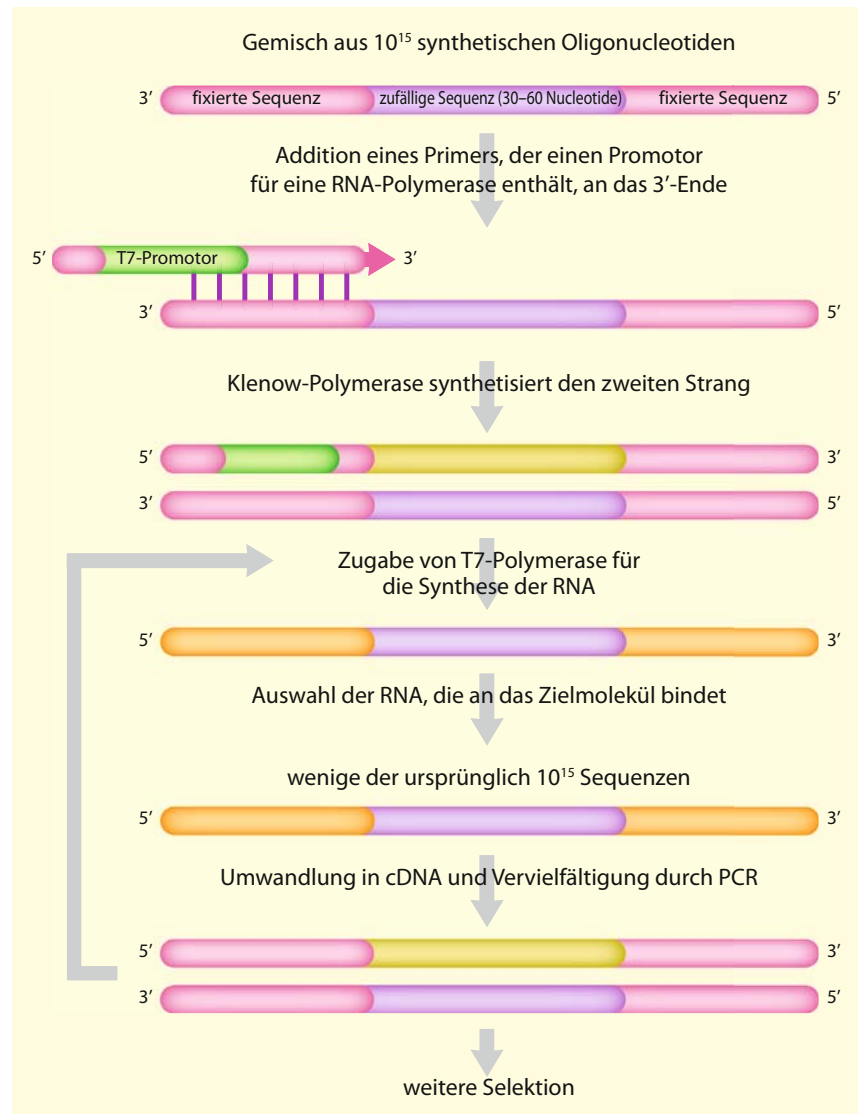
Das Spektrum der möglichen Anwendungen ist bei SELEX größer als bei Ribozymen. Das Verfahren

lässt sich auch auf die Entwicklung von Arzneimitteln und deren Verabreichung anwenden. Beim **DNA-SELEX** wird das anfängliche Gemisch aus Oligonucleotiden mit zufälliger Sequenz nicht durch die RNA-Polymerase in mRNA transkribiert, sondern die Oligonucleotide werden direkt für die Substratbindung und Selektion eingesetzt.

Neue Substrate für ein bekanntes Ribozym lassen sich finden, indem man das gereinigte Ribozym mit einer großen Menge von zufälligen RNA-Sequenzen inkubiert. Jede an das Ribozym bindende RNA-Sequenz ist ein potenzielles Substrat.

5.27 Durch RNA-SELEX lassen sich neue Ribozym-substrate identifizieren

Der Schlüssel zum RNA-SELEX ist die Herstellung eines Gemisches aus sehr vielen zufälligen RNA-Sequenzen. Dazu werden zunächst chemisch DNA-Oligonucleotide synthetisiert. Die dabei entstandenen zufälligen Sequenzen werden mithilfe eines Primers und der Klenow-Polymerase in doppelsträngige DNA umgewandelt. Der Primer enthält einen Promotor für eine RNA-Polymerase. Die dsRNA-Oligonucleotide werden durch eine RNA-Polymerase in RNA transkribiert. Dieses Gemisch zufälliger RNA-Sequenzen wird dann auf die Bindung an das Ribozym hin untersucht. Alle bindenden RNA-Moleküle werden gesammelt, der Rest wird verworfen. Die bindenden Moleküle werden revers in cDNA transkribiert und mithilfe von PCR vervielfältigt. Der Selektionsprozess kann mehrfach wiederholt werden, um die bindenden RNA-Sequenzen anzureichern.

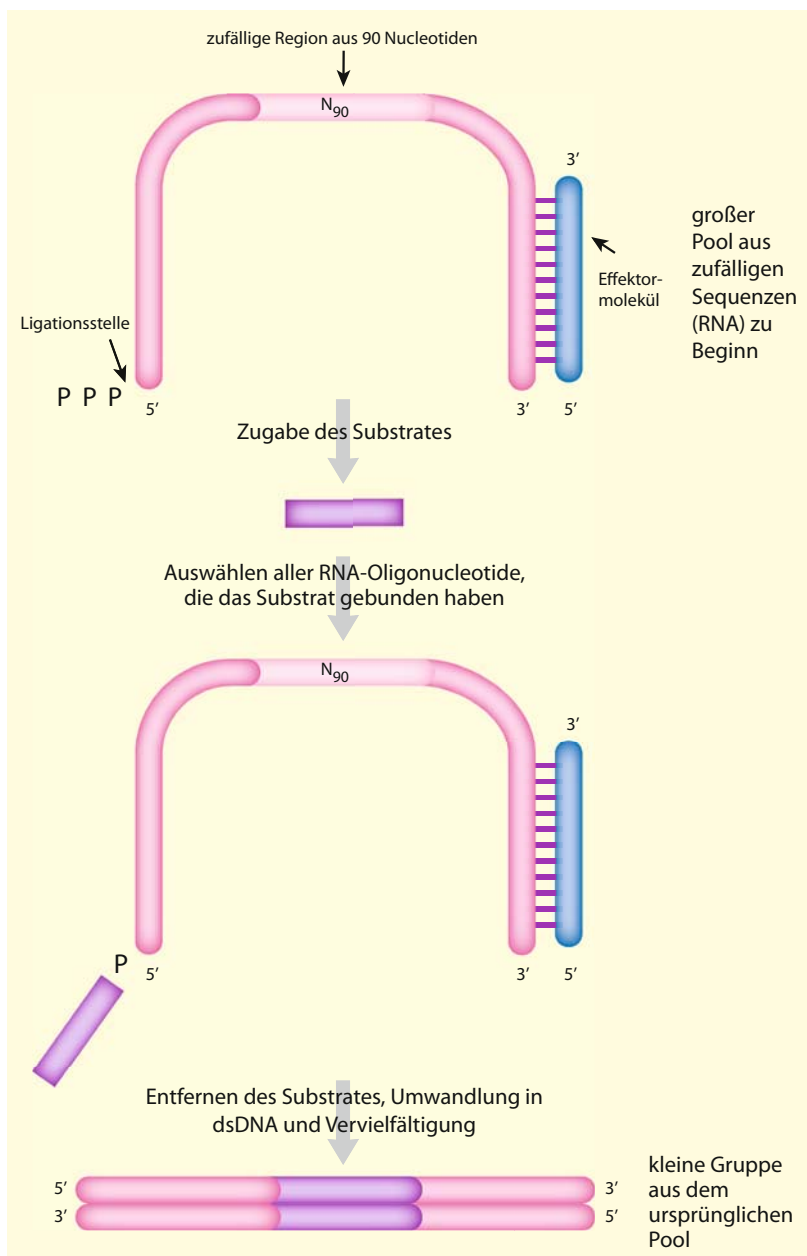


In vitro-Evolution und in vitro-Selektion von Ribozymen

Es ist ebenfalls möglich, aus großen Pools zufälliger RNA-Sequenzen neue Ribozyme mit neuen enzymatischen Eigenschaften zu generieren. Dieses Verfahren lohnt sich, da kleine natürliche Ribozyme in den Spaltungs- und Ligationsreaktionen meist sehr beschränkt sind. Durch die Anwendung der *in vitro*-

Selektion kann man in einem Gemisch aus zufälligen Nucleotidsequenzen neue Ribozymreaktionen ausfindig machen (Abb. 5.28).

So lässt sich z.B. ein Ribozym identifizieren, das die Ligation einer bestimmten Sequenz katalysiert. Dieses Verfahren beginnt mit der Synthese von zufälligen Oligonucleotidsequenzen. Diese stellen einen Pool aus möglichen Ribozymen dar, und nicht, wie bei RNA-SELEX, aus möglichen Substraten. Jede zufällige Sequenz wird von zwei bekannten Sequenzen



5.28 In vitro-Selektion eines Ribozyms, das eine Ligation katalysiert

Das rosafarbene Molekül repräsentiert den großen Pool an zufälligen RNA-Sequenzen. Am 5'-Ende befindet sich eine Substratsequenz mit einem terminalen Triphosphat. Am 3'-Ende befindet sich ein blaues Effektormolekül, um die Ligation zu erleichtern. Das zweite Substrat (violett) wird mit den zufälligen Oligonucleotidsequenzen inkubiert. Wenn eine der zufälligen Sequenzen die Ligation des Substrates katalysiert, wird das entstehende Molekül größer sein und sich durch Gelelektrophorese von den übrigen abtrennen lassen. Das ligierte Oligonucleotid wird aus dem Gel isoliert, durch PCR vervielfältigt und schließlich sequenziert.

flankiert. Die Sequenz am 5'-Ende ist ein Substrat für die gewünschte Ligationsreaktion. Das 5'-Ende trägt ein terminales Triphosphat, das die Energie für die Ligation liefert. Das 3'-Ende hat eine Sequenzdomäne, die an einen Effektor bindet. Dadurch lässt sich die enzymatische Reaktion regulieren. Außerdem ist es durch die bekannten Sequenzen an den beiden Enden möglich, das gesamte Konstrukt durch PCR zu vervielfältigen.

Das Substrat für die Ligation wird mit den potenziellen Ribozymen gemischt und unter Bedingungen inkubiert, die eine Ligation begünstigen. Ligiert eine der Sequenzen das Substrat an ihr 5'-Ende, dann entsteht ein RNA-Molekül (d.h. Ribozym plus Ligationsprodukt), das sich in einem Agarosegel viel langsamer bewegt als die anderen, nichtligierten Sequenzen. Die langsameren Moleküle werden aus dem Gel isoliert. Das mutmaßliche Ribozym wird revers in cDNA transkribiert und schließlich die DNA mithilfe von PCR und Primern, die an das 5'- bzw. 3'-Ende des ursprünglichen RNA-Konstrukts binden, vervielfältigt.

In vitro-Evolution verstärkt die *in vitro*-Selektion, indem nach jeder Selektionsrunde ein Mutageneseschritt eingefügt wird (Abb. 5.29). Dieses Verfahren beginnt wie zuvor mit einem Pool von Oligonucleotiden mit zufälliger Sequenz. Diese Sequenzen können unterschiedlich lang sein, solange ihre Länge für die gewünschte Reaktion ausreicht. Das Sequenzgemisch wird anschließend mutiert. Die effizienteste Methode zur Vervielfältigung des ursprünglichen Gemisches ist eine *error prone*-PCR. Die Vielfalt der Sequenzen im Gemisch wird dadurch größer, da verschiedene Sequenzen hinzukommen. Im nächsten Schritt wird auf die spezifische Sequenz, die die gewünschte Reaktion ausführt, selektiert. So sind z.B. synthetische Ribozyme entwickelt worden, die Metallionen an Mesoporphyrin IX anfügen (s. Abb. 5.29). Mutagenese und Selektion können mehrfach wiederholt werden, wodurch das Ribozym verbessert wird. Ist schließlich ein effizientes Ribozym gefunden, dann lässt sich dessen Sequenz bestimmen, nachdem die RNA revers in cDNA transkribiert wurde.

Synthetische Ribozyme wurden hergestellt, die verschiedene Zentren wie Phosphoribosyl-, Carbonyl- und Alkylhalogenide nucleophil angreifen. Außerdem wurde ein synthetisches Ribozym isoliert, das eine zehngliedrige Ringstruktur isomerisieren kann. In jedem dieser Fälle wurden die ursprünglichen Gemische aus Oligonucleotiden oder Ribozymen auf die Fähigkeit zur Durchführung dieser spezifischen Reaktionen hin selektiert. Sowohl bei der *in vitro*-Selektion als auch bei der *in vitro*-Evolution liegt der Schlüssel

zum Erfolg im Selektionsschritt. Dieser muss ausreichend selektiv sein, damit die meisten nichtfunktionellen RNA-Moleküle herausgefiltert werden. Ist er jedoch zu stringent, werden Ribozyme mit einer schwachen Aktivität zu früh verworfen.

In vitro-Selektion vermag auch neue Ribozyme zu schaffen, indem zufällige Sequenzen, die mögliche Ribozyme repräsentieren, mit spezifischen Substraten gemischt werden.

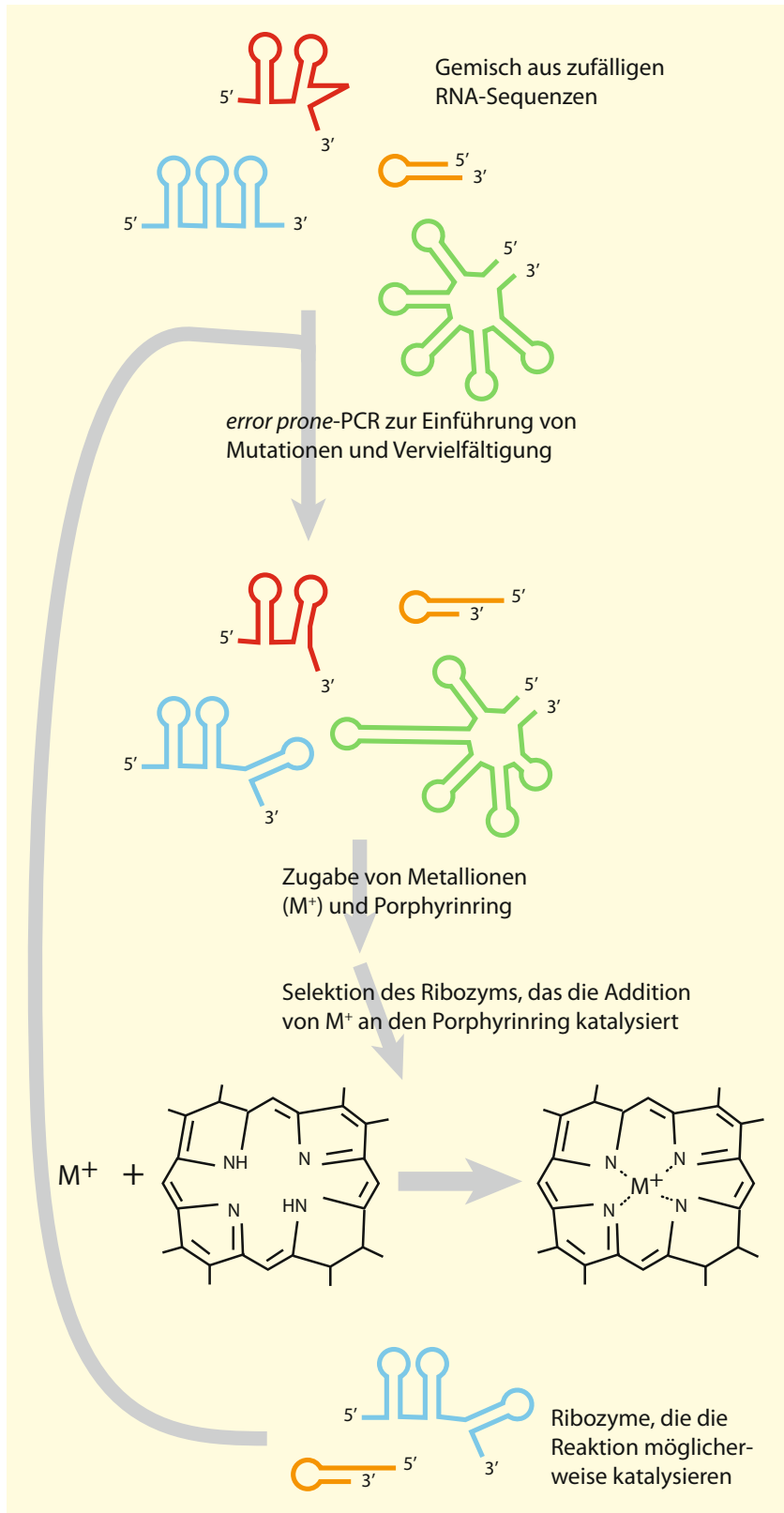
Das Einfügen eines Mutageneseschrittes in die *in vitro*-Selektion erlaubt die „Evolution“ eines Ribozyms zu einem noch leistungsfähigeren Molekül.

Synthetische Ribozyme in der Medizin

Mittlerweile werden Ribozyme auch im Rahmen medizinischer Anwendungen genutzt. Wissenschaftler, die an AIDS forschen, haben ein Hammerkopfribozym entwickelt, das die Replikation von HIV zu hemmen vermag. Dieses gentechnisch veränderte Ribozym war ab 2006 Gegenstand klinischer Studien. Es wird verabreicht, indem das Ribozymgen in einem viralen Vektor exprimiert wird. Der Vektor wird in T-Lymphocyten aus dem peripheren Blut von HIV-infizierten Patienten eingeschleust und man hofft, dass das exprimierte Ribozym die RNA-Form des HIV-Genoms spalten und dadurch die Replikation des Virus verhindern wird.

Ein weiteres Ribozym wurde entwickelt, um ein RNA-Virus, Hepatitis-C-Virus (HCV), zu spalten. HCV ist die Hauptursache der chronischen Hepatitis, gegen das bislang kein Impfstoff zur Verfügung steht. Verschiedene gentechnisch veränderte Ribozyme, die HCV-RNA *in vitro* effizient spalten, wurden identifiziert. Die veränderten Ribozyme erwiesen sich in infizierten Leberzellkulturen als sehr effizient. Am Patienten wurde sie allerdings noch nicht getestet.

Für den klinischen Einsatz von Ribozymen sind, wie bei jedem anderen Arzneistoff auch, viele Hindernisse zu überwinden. Jedes neue Ribozym muss an den richtigen Ort gelangen und in erkrankten Zellen exprimiert werden. Es muss stabil und schwer abbaubar sein. Um dies zu erreichen, enthalten viele Ribozyme modifizierte Basen, die einen Abbau durch zelluläre Endonucleasen verhindern. Schließlich dürfen Ribozyme keine unerwünschten Nebenwirkungen ha-



5.29 *In vitro*-Evolution von Ribozymen

Das Ziel von *in vitro*-Evolution ist es, eine RNA-Sequenz ausfindig zu machen, die eine Ribozymaktivität besitzt. In diesem Beispiel wird nach einem Ribozym gesucht, das die Addition eines Metallions (M^+) an einen Porphyrinring katalysiert. Zunächst werden zufällige RNA-Sequenzen gemischt und mithilfe einer *error prone*-PCR amplifiziert, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, eine oder zwei Sequenzen zu finden, die diese Reaktion katalysieren. Jede folgende Runde aus Selektion und Mutation verbessert die gefundenen Ribozyme.

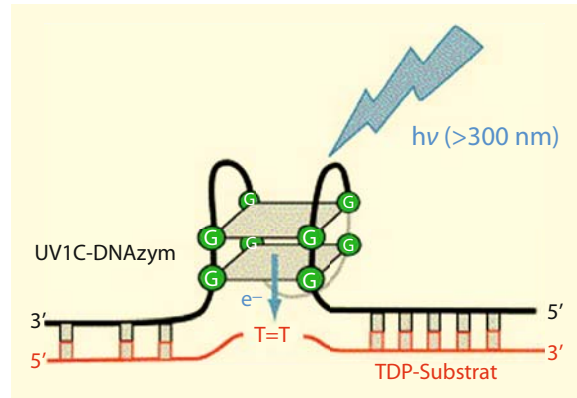
ben. Die hohe Spezifität von Ribozymen für ihre Ziel-moleküle machen sie leistungsfähiger als viele bereits bestehende Therapien. So tötet die Chemotherapie bei Krebspatienten alle sich schnell teilenden Zellen, nicht nur die Krebszellen. Ribozyme erkennen dagegen nur eine spezifische Ziel-mRNA; daher können Behandlungen mit Ribozymen Nebenwirkungen vermeiden, wie sie bei einer Chemotherapie auftreten.

Ribozyme für die Behandlung von Erkrankungen wie Krebs sind vielversprechend, weil sie sehr spezifisch sind.

Allosterische Desoxyribozyme katalysieren spezifische Reaktionen

Weil einige RNAs katalytische Eigenschaften besitzen, wurde untersucht, ob dies auch bei DNA der Fall ist. Obwohl kein natürliches katalytisches DNA-Molekül bekannt ist, besitzt DNA dennoch die Fähigkeit, ähnlich wie die Ribozyme aus RNA, verschiedene Reaktionen zu katalysieren. Tatsächlich wurde eine *in vitro*-Selektion eingesetzt, um ein Desoxyribozym zu entwickeln, das durch UV-Licht entstandene Thyminindimere spaltet. Verschiedene Organismen haben unterschiedliche Mechanismen, um diese Dimere zu beseitigen. So entfernt z.B. die Excisionsreparatur den beschädigten Strang und ersetzt ihn mit neuer DNA. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von **Photolyasen**, Enzymen, die durch Licht aktiviert werden. Sie erkennen und reparieren Thyminindimere als Reaktion auf blaues Licht.

Um DNA-Sequenzen mit einer Photolyaseaktivität zu identifizieren, wurde mit einem Gemisch aus DNA-Oligonucleotiden mit zufälligen Sequenzen eine *in vitro*-Selektion durchgeführt. Die zufälligen Sequenzen wurden zunächst an ein Substrat gebunden, das aus zwei DNA-Oligonucleotiden bestand, welche über ein Thymindimer miteinander verbunden waren. Vermochte das Oligonucleotid das Dimer nach Bestrahlung mit blauem Licht zu spalten, dann war die Länge des DNA-Konstruktes geringer als ohne Spaltung. Die kleineren Abschnitte wurden durch Gelelektrophorese abgetrennt und isoliert. Dieser Ansatz war erfolgreich und ein spezifisches Desoxyribozym (UV1C) mit Photolyaseaktivität konnte identifiziert werden (Abb. 5.30).



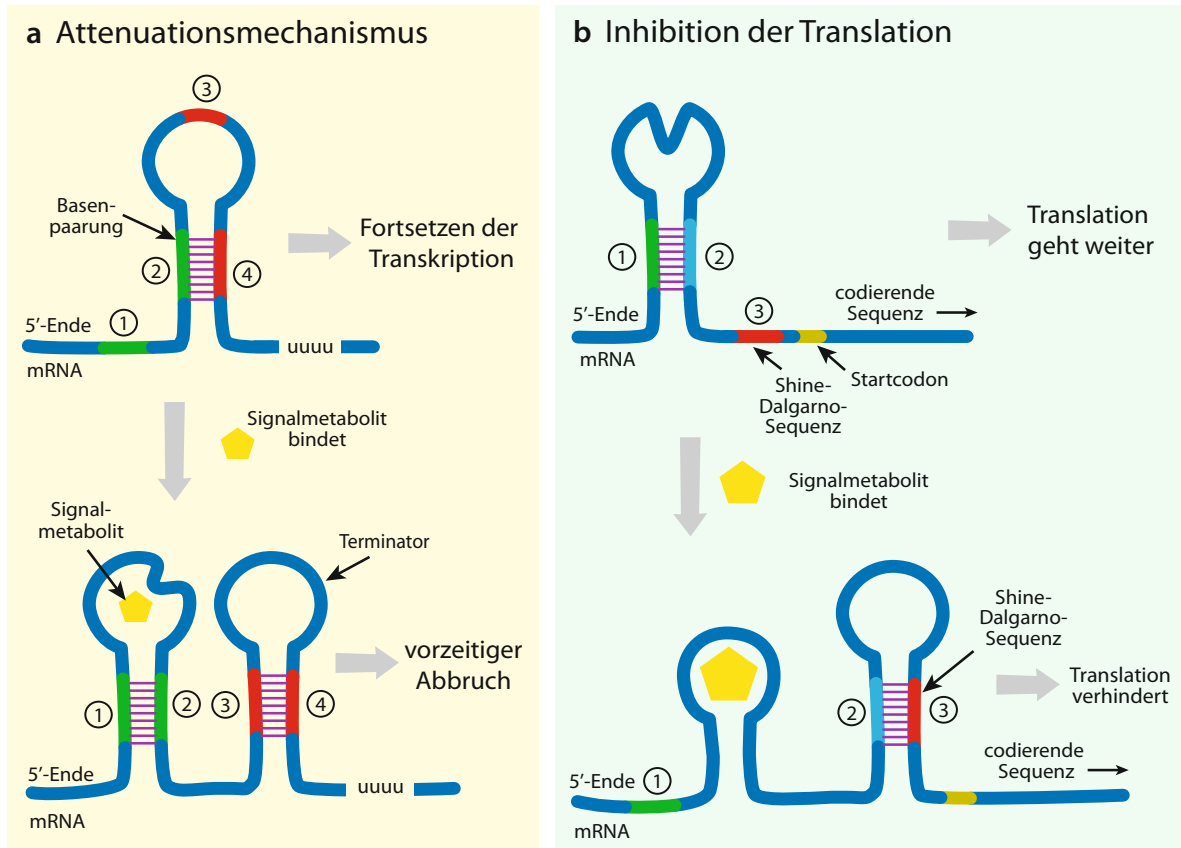
5.30 Ein Desoxyribozym, das Thyminindimere repariert

Ein Modell des Komplexes bestehend aus dem Desoxyribozym UV1C und dem Substrat. Lichtenergie wird durch die Guaninquadruplex absorbiert. Man nimmt an, dass das Thymindimer dicht neben dem Guanincluster innerhalb des gefalteten Desoxyribozyms liegt. Dadurch können Elektronen von den angeregten Guaninresten zum Thymindimer fließen. Aus: Chinnappen and Sen (2007) Towards elucidation of the mechanism of UV1C, a deoxyribozyme with photolyase activity. *J Mol Biol* 365: 1326–1336. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.

Desoxyribozyme sind DNA-Sequenzen, die eine enzymatische Reaktion katalysieren.

Riboschalter werden durch Effektormoleküle reguliert

Die Transkription wird hauptsächlich durch Proteinfaktoren kontrolliert. Dennoch wurden in Prokaryoten konservierte Sequenzen entdeckt, die die Genexpression auf Ebene der RNA regulieren. Diese Sequenzen sind integrale Bestandteile der Messenger-RNA-Moleküle, die sie kontrollieren, und werden als **Riboschalter** (engl. *riboswitches*) bezeichnet. Im Gegensatz zu miRNAs oder siRNAs, die über Basenpaarungen wirken, binden Riboschalter kleine Effektormoleküle wie Nährstoffe oder cAMP. Die Schalter wirken, indem sie zwischen zwei verschiedenen RNA-Sekundärstrukturen wechseln. In den meisten Fällen beendet die Bindung eines Effektors die Transkription vorzeitig oder sie verhindert die Translation der mRNA.



5.31 Riboschalter kontrollieren die mRNA-Expression

Riboschalter wechseln zwischen zwei Stamm-Schleife-Strukturen, abhängig von der An- bzw. Abwesenheit eines Signalmetaboliten. **a** Bei der Attenuation führt die Anwesenheit des Signalmetaboliten zur Bildung einer Terminatorschleife, und die Transkription wird abgebrochen. **b** Bei der Translationsinhibition bewirkt die Anwesenheit des Metaboliten, dass die Shine-Dalgarno-Sequenz blockiert und die Translation der mRNA verhindert wird.

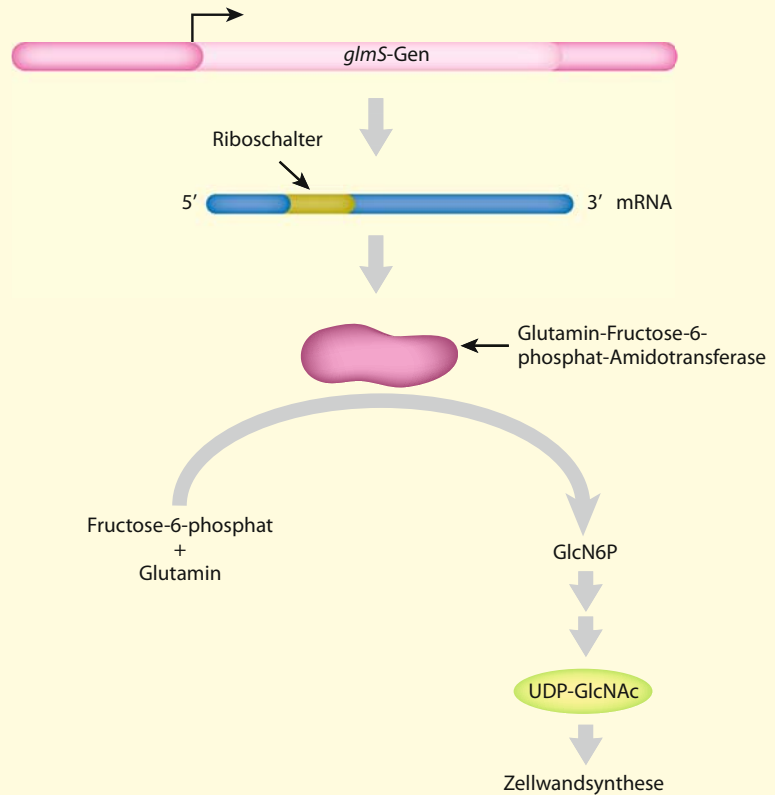
Riboschalter kommen in vielen Genen für biosynthetische Enzyme vor. In *E. coli* wird der Thiaminriboschalter durch das Vitamin Thiaminpyrophosphat kontrolliert. Liegt das Vitamin in ausreichender Menge vor, dann bindet es an die TH1-Box (d.h. einen Riboschalter) in der Nähe des 5'-Endes der mRNA, und die Transkription des Gens bricht ab. Herrscht Vitaminmangel, wird die mRNA translatiert und es werden Enzyme gebildet, die mehr Thiamin produzieren. Eine ähnliche Kontrolle findet bei der Riboflavinbiosynthese in *Bacillus subtilis* statt. Das Vitamin selbst bindet an die Riboschalterdomäne auf der mRNA und bestimmt so, ob die mRNA translatiert wird oder nicht.

Riboschalter wirken normalerweise über die Stamm-Schleife-Struktur des mRNA-Transkripts. Bei Riboschaltern, die bei der **Attenuation** aktiv sind,

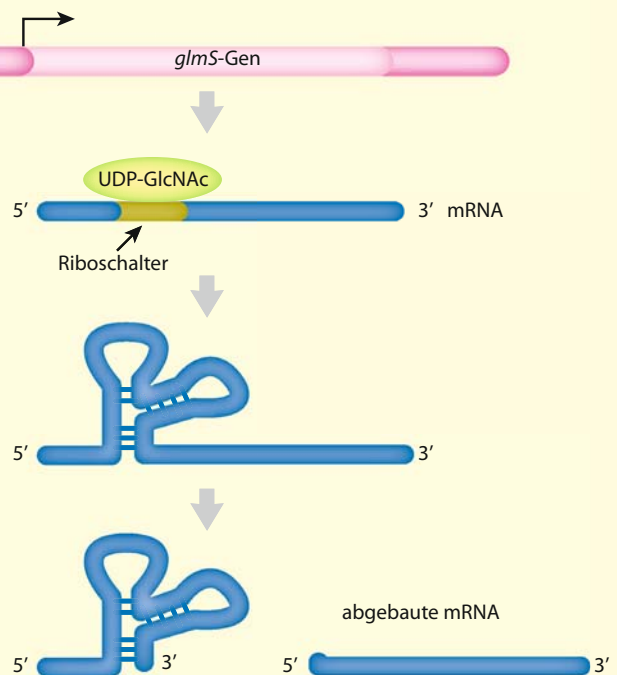
bindet das Effektormolekül an die mRNA, wenn diese synthetisiert wird. Die Bindung beeinflusst die Struktur, und es bildet sich eine Terminatorschleife, die bewirkt, dass die Translationsmaschinerie vorzeitig abfällt. Die unvollständige RNA wird abgebaut. Besteht ein Mangel an Effektormolekülen, wird die mRNA vollständig synthetisiert (Abb. 5.31a). Alternativ wirken Riboschalter über die Hemmung der Translation. In diesem Fall kontrolliert der Riboschalter über eine Blockierung der Shine-Dalgarno-Sequenz, ob die Translation stattfindet oder nicht. Ist das Effektormolekül häufig, dann verändert seine Bindung die Stamm-Schleife-Struktur, sodass die Shine-Dalgarno-Sequenz für die Ribosomen nicht zugänglich ist (s. Abb. 5.31b).

Vor kurzem konnte man in *Bacillus subtilis* einen neuen Riboschalter identifizieren, der die Expression

a niedrige Konzentration an UDP-GlcNAc



b hohe Konzentration an UDP-GlcNAc



5.32 Ribozymriboschalter des *glmS*-Gens aus *B. subtilis*

a Die Zellwandsynthese findet unter Wachstumsbedingungen statt. Wächst die Zelle, dann ist die Konzentration von UDP-GlcNAc gering, und die Moleküle werden rasch zu Zellwandkomponenten umgesetzt. **b** Wächst die Zelle nicht, dann wird UDP-GlcNAc nicht in die Zellwand eingebaut und reichert sich an. Überschüssiges UDP-GlcNAc bindet an einen Riboschalter auf dem *glmS*-Gen. Dadurch wird das selbstspaltende Ribozym aktiviert, die mRNA abgebaut und die Bildung von Glutamin-Fructose-6-phosphat-Amidotransferase stoppt.

eines Gens (*glmS*) kontrolliert, das an der Biosynthese von Zellwandkomponenten beteiligt ist (Abb. 5.32). Wie bei anderen Schaltern auch, bestimmt ein Produkt des Biosyntheseweges, ob die mRNA translatiert wird oder nicht. Statt jedoch die Shine-Dalgarno-Sequenz unzugänglich zu machen oder eine Terminatorschleife zu bilden, entsteht durch die Veränderung der mRNA-Sekundärstruktur ein selbstspaltendes Ribozym. Das *glmS*-Gen aus *Bacillus subtilis* codiert das Enzym Glutamin-Fructose-6-phosphat-Amidotransferase, das Fructose-6-phosphat und Glutamin in Glucosamin-6-phosphat (GlcN6P) umwandelt. Aus dieser Verbindung entsteht die Zellwandkomponente UDP-GlcNAc. Ist die vorhandene Menge an GlcNAc groß, dann bindet das Molekül an die *glmS*-mRNA und verändert die Sekundärstruktur. Die neue Struktur wirkt als Ribozym, das die mRNA spaltet und so eine Translation verhindert.

Es wurden auch andere Riboschalter identifiziert, die direkt auf Temperaturstress reagieren. So ist z.B. das *rpoH*-Gen aus *E. coli* an der Hitzeschockreaktion beteiligt. Zusätzlich zu anderen Formen der Regulation enthält die mRNA eine Thermosensordomäne, die die Stärke der Translation kontrolliert. Bei normalen Temperaturen besitzt der Thermosensor eine Stamm-Schleife-Struktur, die die Translation verhindert. Steigt die Temperatur an, löst sich die Stamm-Schleife-Struktur auf und die Translation kann stattfinden.

Riboschalter sind mRNA-Sequenzen, die direkt an die Effektormoleküle binden, um die Translation der mRNA zu kontrollieren.

Die gentechnische Veränderung allosterischer Riboschalter und Ribozyme

Synthetische oder veränderte Ribozyme haben hinsichtlich eines Einsatzes in der Medizin und Biotechnologie ein außerordentlich großes Potenzial. Die Möglichkeit, die Aktivität eines Ribozyms kontrollieren zu können, wäre sehr vorteilhaft. Würde ein Ribozym gentechnisch so verändert, dass es mRNA spaltet, die in Krebszellen zu ungehemmtem Wachstum führt, dann könnte eine Kontrolle ihrer Aktivität den Krebs an der Ausbreitung hindern. Außerdem

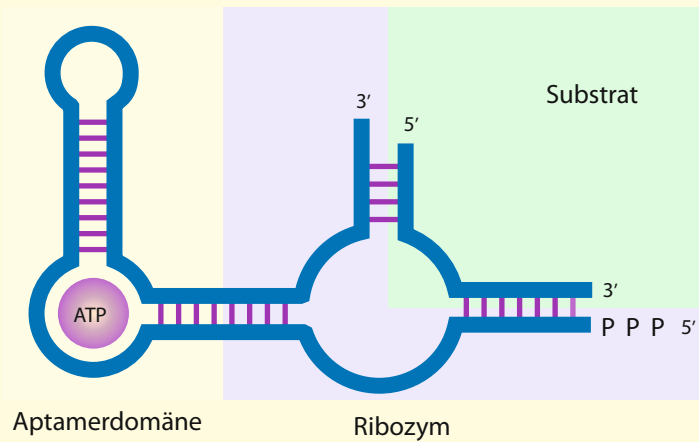
könnten Ribozyme in Gene eingebracht werden, die in der Gentherapie zum Einsatz kommen. Wie und wann diese Gene exprimiert werden, ließe sich durch die Kontrolle des Ribozyms bestimmen. An einer solchen Kontrolle wären Riboschalter beteiligt, die mit Ribozymen gekoppelt sind. Auf diese Weise ließe sich die Selbstzerstörung durch die Zugabe kleiner Effektormoleküle regulieren, wie es in der Natur beim zuvor beschriebenen *glmS*-Gen bereits geschieht.

Um ein Ribozym dahingehend zu verändern, dass es nur in Anwesenheit eines bestimmten Effektormoleküls aktiv ist, wird eine Kombination aus **modularem Design** und *in vitro*-Selektion eingesetzt. Beim modularen Design werden verschiedene Domänen von unterschiedlichen Ribozymen zu einem neuen Molekül zusammengestellt. So lässt sich das katalytische Zentrum eines bestimmten Hammerkopfribozyms mit der Bindungsdomäne eines anderen Ribozyms koppeln, wodurch sich die Bindungsspezifität des ursprünglichen Ribozyms verändert (Abb. 5.33a).

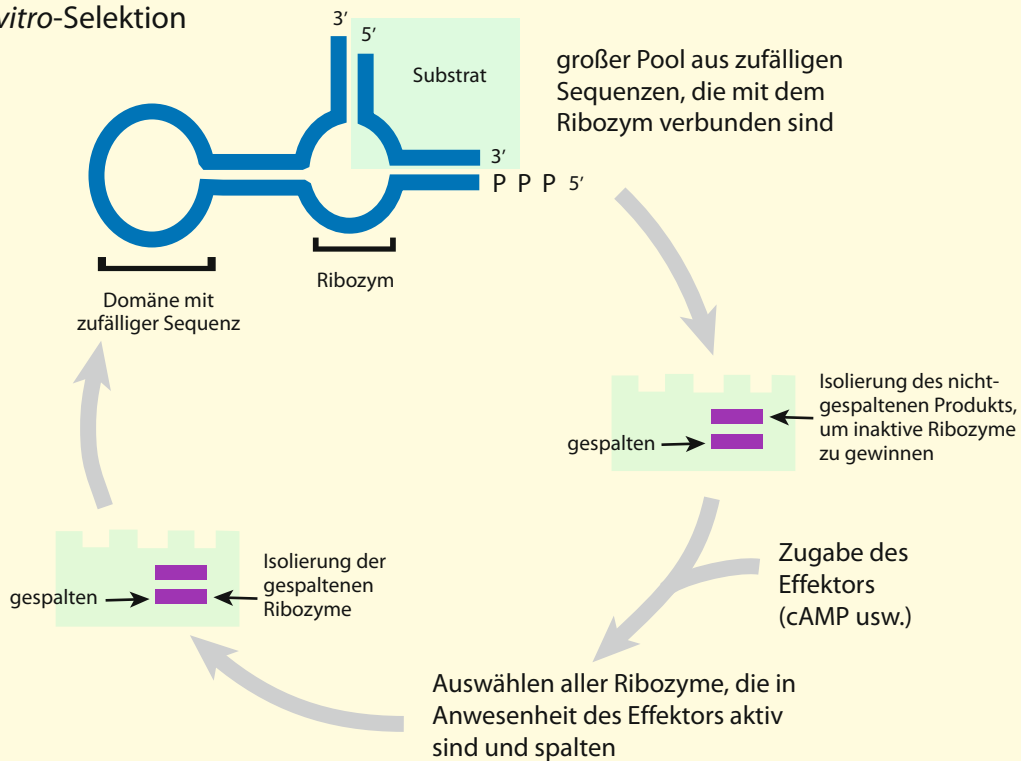
Synthetische allosterische Ribozyme werden durch die Kombination der katalytischen Zentren von Ribozymen mit verschiedenen zufälligen Sequenzen selektiert (s. Abb. 5.33b). Einige der zufälligen Sequenzen werden, wie man hofft, den gewählten Effektor binden, sie stellen ein Gemisch aus möglichen Riboschaltern dar. Einige dieser kombinierten Moleküle werden sich selbst oder das Substrat ohne Regulation spalten und müssen aus dem Gemisch entfernt werden. Spaltet das Ribozymkonstrukt sich selbst, dann werden sich die Produkte schneller durch ein Elektrophoresegel bewegen als die nichtgespaltenen. Daher wird das Gemisch aus möglichen Riboschaltern/Ribozymen elektrophoretisch aufgetrennt und die langsameren, nichtgeschnittenen RNA-Moleküle aus dem Gel isoliert. Als nächstes werden die Ribozyme mit dem gewählten Effektor gemischt und unter Bedingungen inkubiert, die die Spaltung fördern. Dieser Schritt ist der positive Selektionsschritt. Jedes Ribozym, das in Anwesenheit des Effektors gespalten wird, wird isoliert. Wie zuvor werden die Ribozyme durch Gelelektrophorese getrennt, doch dieses Mal werden die gespaltenen (kürzeren) Moleküle isoliert. Durch Klonierung und Sequenzierung der isolierten Ribozymkonstrukte bestimmt man schließlich die Sequenz der Riboschalterdomäne.

Ribozyme lassen sich mit Riboschaltern ausstatten. Der Riboschalter kontrolliert das Ribozym, sodass es nur dann aktiv ist, wenn das Effektormolekül vorhanden ist.

a allosterisches Ribozym



b *in vitro*-Selektion



5.33 Entwicklung von allosterischen Ribozymen

a Modulares Design eines Ribozyms. Das Ribozym besteht aus drei verschiedenen, miteinander verbundenen Domänen. Die Substratdomäne (hellgrün hinterlegt) geht Basenpaarungen mit der Ribozymdomäne (hellviolette Hinterlegung) ein, und die Aptamerdomäne bindet den allosterischen Effektor (in diesem Beispiel ATP). **b** Schema für die *in vitro*-Selektion zur Identifizierung von Ribozymen, die nur dann aktiv sind, wenn ein Effektor gebunden hat (d.h. die allosterisch sind). Zunächst werden alle Ribozyme, die die Spaltung des Substrats ohne die Bindung eines Effektors katalysieren, entfernt. Wird das Substrat ohne Effektor gespalten, dann wandert das Ribozym während der Gelelektrophorese schneller. Nur die Bande mit ungeschnittenem Substrat/Ribozym wird aus dem Gel isoliert. Als nächstes werden die Ribozyme mit dem Effektormolekül gemischt. Dieses Mal werden die Ribozyme, die das Substrat spalten, isoliert. Durch wiederholte Zyklen der Isolierung erhält man am Ende ein Ribozym, das nur aktiv ist, wenn ein Effektor gebunden hat.

► Weiterführende Literatur

- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005) MicroRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207–221
- Breaker RR (2002) Engineered allosteric ribozymes as biosensor components. *Curr Opin Biotechnol* 13: 31–39
- Chen Q, Crosa JH (1996) Antisense RNA, Fur, iron and the regulation of iron transport genes in *Vibrio anguillarum*. *J Biol Chem* 271: 18885–18891
- Chinnapen DJ-F, Sen D (2003) A deoxyribozyme that harnesses light to repair thymine dimers in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 65–69
- Chinnapen DJ-F, Sen D (2007) Towards elucidation of the mechanism of UV1C, a deoxyribozyme with photolyase activity. *J Mol Biol* 365: 1326–1336
- Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Crosthwaite SK (2004) Circadian clocks and natural antisense RNA. *FEBS Lett* 567: 49–54
- Dias N, Stein CA (2002) Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 1: 347–355
- Elgin SC, Grewel SI (2003) Heterochromatin: Silence is golden. *Curr Biol* 13: R895–R898
- Fitzwater T, Polisky B (1996) A SELEX primer. *Methods Enzymol* 267: 275–301
- Golden BL, Kim H, Chase E (2004) Crystal structure of a phage Twort group I ribozyme-product complex. *Nat Struct Mol Biol* 12: 82–89
- Jansohn M (2006) *Gentechnische Methoden*, 4. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Khan AU, Lal SK (2003) Ribozymes: A modern tool in medicine. *J Biomed Sci* 10: 457–467
- Knee R, Murphy PR (1997) Regulation of gene expression by natural antisense RNA transcripts. *Neurochem Int* 31: 379–392
- Lai EC (2003) MicroRNAs: Runts of the genome assert themselves. *Curr Biol* 13: R925–R936
- Lochmann D, Jauk E, Zimmer A (2004) Drug delivery of oligonucleotides by peptides. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 237–251
- Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A (2001) Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* 11: 171–176
- Mülhardt C (2008) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 6. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Preall JB, Sontheimer EJ (2005) RNAi: RISC gets loaded. *Cell* 123: 543–545
- Rossignol F, de Laplanche E, Mounier R, Bonnefont J, Cayre A, Godinot C, Simonnet H, Clottes E (2004) Natural antisense transcripts of HIF-1 α are conserved in rodents. *Gene* 339: 121–130
- Sazani P, Vacek MM, Kole R (2002) Short-term and long-term modulation of gene expression by antisense therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 13: 468–472
- Sen G, Wehrman TS, Myers JW, Blau HM (2004) Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nat Genet* 36: 183–189
- Tanner NK (1998) Ribozymes: The characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Micro Rev* 23: 257–275
- Tsang J, Joyce GF (1996) *In vitro* evolution of randomized ribozymes. *Methods Enzymol* 267: 410–426
- van Rij RP, Andino R (2006) The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. *Trends Biotechnol* 24: 186–193
- Vanhée-Brossollet C, Vanquero C (1998) Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes? *Gene* 211: 1–9
- Vaucheret H, Béclin C, Fagard M (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* 114: 3083–3091
- Warashina M, Takagi Y, Stec WJ, Taira K (2000) Differences among mechanisms of ribozyme-catalyzed reactions. *Curr Opin Biotechnol* 11: 354–362

Immuntechnologie

Struktur und Funktion eines Antikörpers

Antikörper, Antigene und Epitope

Die große Vielfalt der Antikörper

Die Struktur eines Antikörpers

Struktur und Funktion von Immunglobulinen

Monoklonale Antikörper für klinische Zwecke

Humanisierung von monoklonalen Antikörpern

Humanisierte Antikörper in klinischen Anwendungen

Gentechnische Veränderung von Antikörpern

Diabodies und bispezifische Antikörperkonstrukte

ELISA-Assay

Der ELISA als Werkzeug zur Diagnose

Sichtbarmachung von Zellbestandteilen mithilfe von Antikörpern

Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

Immunologisches Gedächtnis und Impfung

Herstellung eines Impfstoffes

Herstellung von Vektorimpfstoffen durch homologe Rekombination

Reverse Impfstoffentwicklung

Identifizierung neuer Antigene für Impfstoffe

DNA-Impfstoffe machen eine Aufreinigung von Antigenen überflüssig

Orale Impfstoffe

Weiterführende Literatur

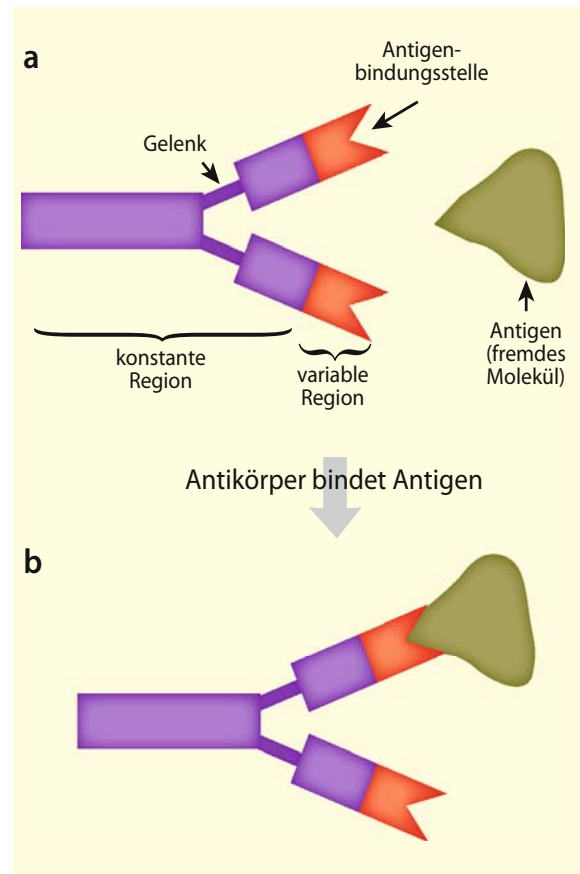
Struktur und Funktion eines Antikörpers

Wir sind ständig von infektiösen Bakterien, Viren und Protozoen umgeben, die alle nach einem geeigneten Wirt für eine Infektion suchen. Würde sich unser Körper nicht gegen diese Invasionsversuche zur Wehr setzen, dann würde er diese Angriffe nicht überleben. Glücklicherweise kontrollieren Zellen des Immunsystems unsere inneren Gewebe, das Blut und die Körperoberfläche sowohl im Inneren des Körpers als auch auf der Außenseite und schützen den Organismus auf diese Weise. Jedes fremde Makromolekül, das nicht als „selbst“, also vom eigenen Körper stammend, erkannt wird, wird als Zeichen eines Angriffs gewertet und löst eine Immunantwort aus. Eindringende Mikroorganismen besitzen eigene Proteine, die sich in der Sequenz und dreidimensionalen Struktur von denen des Wirts unterscheiden. Vor allem die Moleküle, die sich auf der Oberfläche des eindringenden Mikroorganismus befinden, ziehen die Aufmerksamkeit des Immunsystems auf sich. Diese fremden Moleküle werden als **Antigene** bezeichnet und die Moleküle des Immunsystems, die sie erkennen und binden, als **Antikörper** (Abb. 6.1).

Häufig ist die Rede davon, dass der Körper Antikörper als Reaktion auf das Eindringen eines fremden Antigens produziert, eine Darstellung, die ein wenig irreführend ist. Tatsächlich bildet das Immunsystem schon lange vor einer Infektion Milliarden von verschiedenen Antikörpern. Jede **B-Zelle** des Immunsystems vermag jedoch nur Antikörper mit einer einzigen Spezifität zu synthetisieren. Noch vor einem Kontakt mit Antigenen und ohne zu wissen, welche Antikörper zukünftig für eine Abwehr notwendig sind, behält das Immunsystem für die Synthese jedes Antikörpers einige wenige B-Zellen.

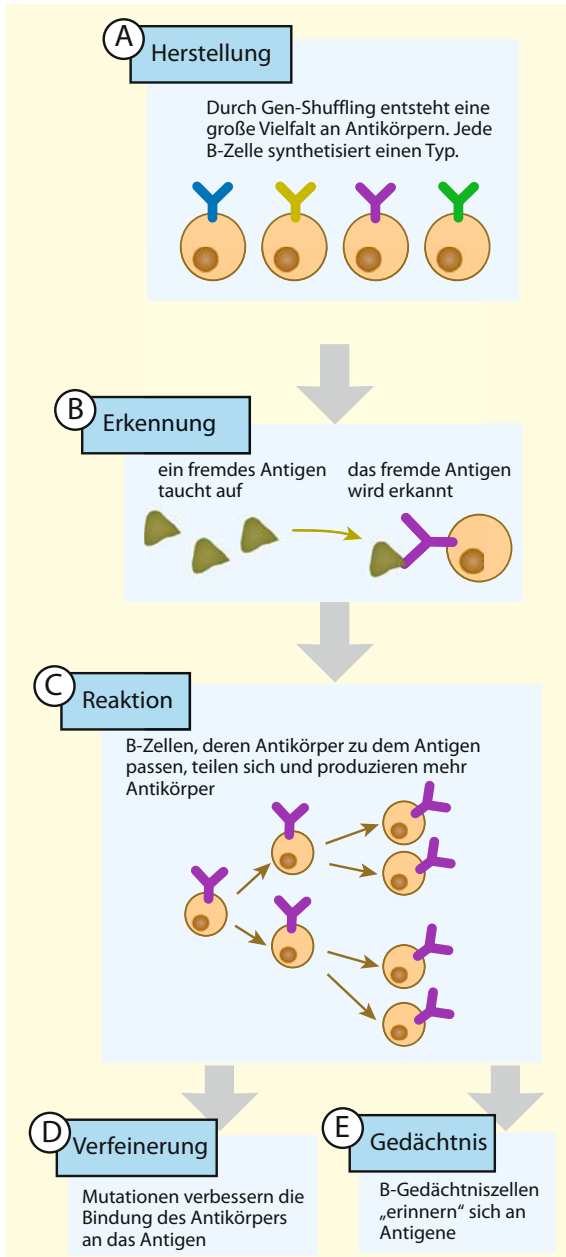
Taucht schließlich ein fremdes Antigen auf, werden unter den Milliarden der bereits synthetisierten Antikörper ein oder zwei zu dem Antigen passen, auch wenn der Körper zuvor niemals mit ihm in Kontakt getreten ist (Abb. 6.2). Die B-Zellen, die die jeweiligen passenden Antikörper produzieren, teilen sich nun rasch und es entstehen sehr viele dieser Zellen. Das Antigen bestimmt daher, welcher Antikörper in großen Mengen produziert wird. Hat ein passender Antikörper an eindringende Antigene gebunden, treten andere Mechanismen des Immunsystems in Aktion, die die Eindringlinge zerstören.

Einige Zeit später beginnt eine Phase der Verfeinerung und Anpassung, in der die Antikörper, die an das eindringende Antigen gebunden haben, durch Mutation verändert werden. Durch einen Selektionsprozess werden die ausgewählt, die am besten zum Antigen passen. Außerdem besitzt das Immunsystem ein Gedächtnis für Antikörper, die bereits zum Einsatz gekommen sind. Greift der gleiche Eindringling nochmals an, kann der entsprechende Antikörper schneller und in noch größerer Zahl als zuvor aktiv werden. Impfstoffe nutzen diese Fähigkeit, indem sie das Immunsystem stimulieren, Antikörper zu speichern, die pathogene Viren wie Pockenviren erkennen und zerstören. Die heutzutage verwendeten Impfstoffe verursachen selbst keine Krankheitssymptome (s. unten).



6.1 Fremde Antigene werden von Antikörpern erkannt

a Antikörper sind Moleküle, die die Form eines „Y“ besitzen und die vom Immunsystem der Wirbeltiere gebildet werden. **b** Die Antikörper binden spezifisch an Proteine, oder Antigene, eindringender Pathogene.



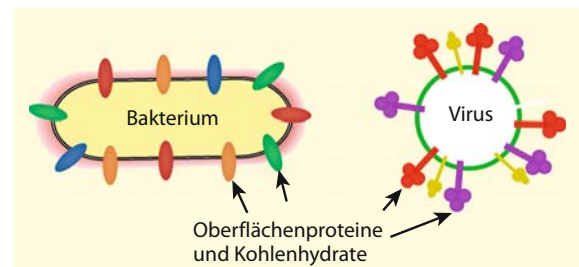
6.2 Für fremde Antigene stehen bereits synthetisierte Antikörper bereit

Lange vor einem Angriff durch ein Pathogen bilden B-Zellen eine Vielzahl von Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität (a). Bindet einer von ihnen an ein Antigen (b), dann beginnt die entsprechende B-Zelle sich zu teilen (c). Die Mehrzahl der B-Zellen ist an der Anpassung und Verbesserung des Antikörpers beteiligt, die Bindung zwischen Antigen und Antikörper wird stärker, und sie wehren die Pathogene ab (d). Ein kleiner Teil der B-Zellen wird in Gedächtniszellen umgewandelt, die niemals absterben und auf einen weiteren Angriff des gleichen Pathogens warten (e).

Das Immunsystem bevorratet eine Reihe von B-Zellen, die bereit sind, Antikörper gegen eindringende Pathogene zu produzieren. Jede B-Zelle stellt dabei einen Antikörper mit einer anderen Spezifität her. Wird einer dieser Antikörper benötigt, beginnt die B-Zelle sich zu teilen, sodass schließlich viele Klone Antikörper produzieren. Einige dieser Klone werden durch Mutation angepasst, was zur Bildung von spezifischeren Antikörpern führt.

Antikörper, Antigene und Epitope

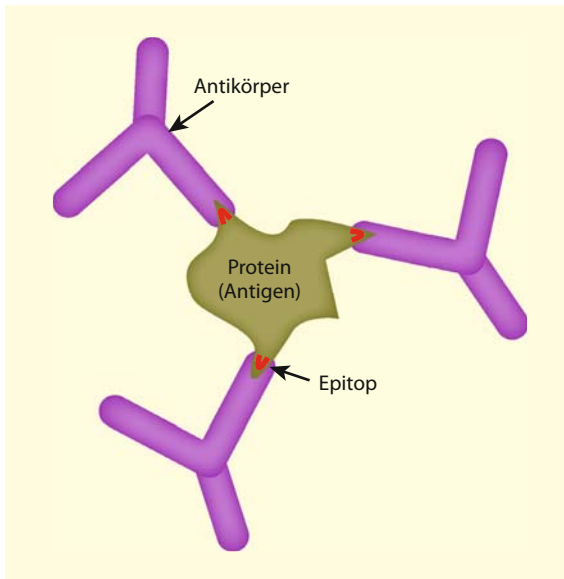
Die Bezeichnung „Antigen“ bezieht sich auf jedes fremde Molekül, das eine Reaktion des Immunsystems auslöst. In der Praxis sind die meisten Antigene Proteine, die von den eindringenden Bakterien oder Viren synthetisiert werden. Besonders kohlenhydrathaltige Glykoproteine, und Lipoproteine, die Lipide enthalten, führen zu starken Reaktionen des Immunsystems – sie haben eine stark antigene Wirkung. Auch Polysaccharide sind häufig Bestandteile der Oberfläche von eindringenden Keimen und stellen Antigene dar. Sogar DNA kann unter bestimmten Bedingungen eine antigene Wirkung besitzen. Es überrascht nicht, dass die Antigene, die sich auf der Oberfläche eines fremden Mikroorganismus befinden, in der Regel als erstes vom Immunsystem erkannt werden (Abb. 6.3). Im weiteren Verlauf der Infektion, insbesondere nachdem die Zellen einiger Eindringlinge vom Immunsystem zerstört wurden, werden Moleküle aus dem Inneren des infektiösen Agens freigesetzt und wirken ebenfalls als Antigene.



6.3 Oberflächenantigene von Mikroorganismen

Die Oberflächen von Bakterien und Viren sind mit Glykoproteinen und Lipoproteinen bedeckt, die von Antikörpern des Wirtsorganismus erkannt werden.

Das Immunsystem vermittelt Immunität gegenüber den verschiedensten infektiösen Agenzien über die **spezifische Immunität**, auch als adaptive oder **erworbene Immunität** bezeichnet. Die erworbene Immunität wird weiter unterteilt in die **humorale Immunität** und die **zellvermittelte Immunität**. Die humorale Immunität wird durch **Immunglobuline** (Antikörper) im Blutplasma vermittelt, die von den B-Zellen synthetisiert werden. Die zellvermittelte Immunität verläuft dagegen über antigenspezifische Zellen, die man als **T-Lymphocyten** bezeichnet. Die T-Lymphocyten werden in T_H -Zellen (oder T-Helferzellen) und T_C -Zellen (oder cytotoxische T-Zellen) unterteilt. Antikörper binden im Allgemeinen an ganze Proteine, während es bei T-Zell-Rezeptoren Proteinfragmente sind. Bindet ein Antikörper ein Protein, dann erkennt er einen relativ kleinen Bereich auf der Oberfläche des Proteins wie Vertiefungen oder Vorsprünge der Oberfläche. Solche Erkennungsstellen bezeichnet man als **Epitope** (Abb. 6.4). Da intakte Proteine relativ große Moleküle sind, bietet ihre Oberfläche eine Vielzahl von Epitopen, sodass viele verschiedene Antikörper an ein Protein binden können. Diese Bindungen finden aufgrund der Größe der Antikörper allerdings nicht gleichzeitig statt.



6.4 Antikörper binden an Epitope auf einem Antigen
Antikörper erkennen nur einen kleinen Vorsprung oder eine Vertiefung auf der Oberfläche des Proteins. Der Bereich des Antigens, an den der Antikörper bindet, wird als Epitop bezeichnet.

T-Zellen funktionieren in ähnlicher Weise, doch erkennen sie ausschließlich Antigene, die auf der Oberfläche anderer Körperzellen präsentiert werden. Zu diesen Körperzellen zählen insbesondere Makrophagen, virusinfizierte Zellen oder antikörperproduzierende B-Zellen. T-Zellen erkennen diese anderen Zellen an Rezeptorproteinen auf deren Oberfläche, die als **Klasse-I- und Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplexe** (**Klasse-I- und Klasse-II-MHCs**) bezeichnet werden. Klasse-I-MHCs aktivieren T_H -Zellen und Klasse-II-MHCs aktivieren T_C -Zellen. MHC-Rezeptoren werden von einer Genfamilie codiert, die von Individuum zu Individuum verschieden ist. Anhand der MHC-Rezeptoren lassen sich Personen unterscheiden, und vor Organtransplantationen muss festgestellt werden, ob Spender und Empfänger zueinander passen, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden. Man nennt MHC-Rezeptoren auch **humane Leukocytenantigene (HLAs)**.

Die erworbene Immunität lässt sich unterteilen. Die humorale Immunität wird durch Antikörper im Blutplasma vermittelt, welche von den B-Zellen synthetisiert werden. Die zelluläre Immunität wird von den T-Zellen vermittelt.

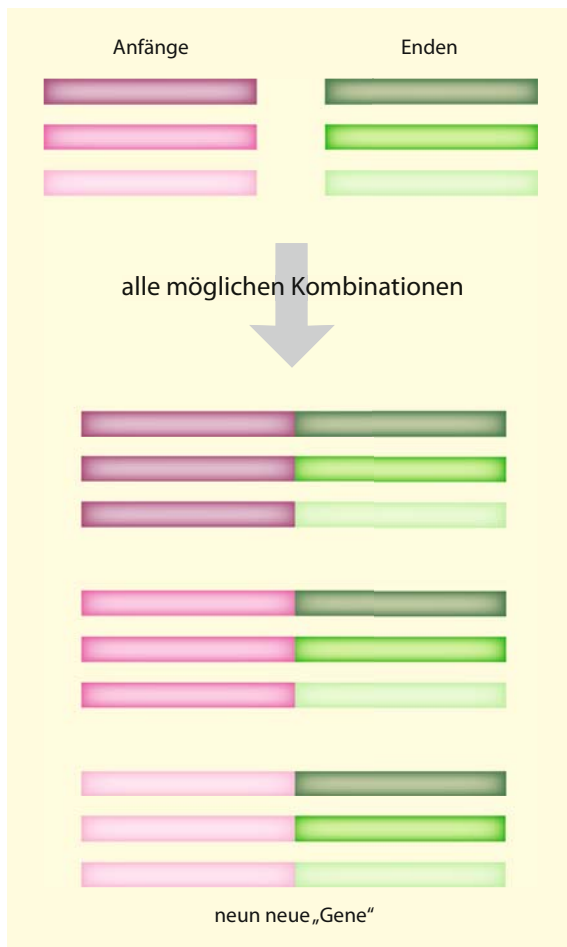
Antikörper erkennen die Zelloberflächenrezeptoren, die als Klasse-I- und Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplexe bezeichnet und auf der Oberfläche von Körperzellen exprimiert werden, welche von einem eindringenden Pathogen infiziert sind.

Die große Vielfalt der Antikörper

Antikörper sind Proteine, die fremde Moleküle erkennen und binden. Da es eine nahezu unendliche Zahl von möglichen fremden Molekülen gibt, muss eine entsprechend große Zahl an verschiedenen Antikörpermolekülen gebildet werden. Die Aminosäuren, aus denen Proteine bestehen, bieten vielfältige Möglichkeiten für verschiedene Sequenzen und verschiedene Formen. Doch damit verbunden ist ein großes genetisches Problem. Würde jeder Antikörper von einem einzelnen Gen codiert, wären eine gigantische Zahl an Genen und eine riesige Menge an DNA notwendig. Selbst wenn das gesamte Säuregenom codierende DNA wäre, könnten nur einige

wenige Millionen Antikörper codiert werden, was bei weitem nicht ausreicht.

Die Lösung ist, dass das Immunsystem mit relativ wenigen Genen eine riesige Zahl an unterschiedlichen Aminosäuresequenzen generiert, indem Gensegmente verschoben werden. Statt für jeden Antikörper die vollständigen Gene zu speichern, setzt das Immunsystem die Antikörpergene aus einer Reihe kürzerer DNA-Abschnitte zusammen. Shuffling (Umlagerung) und Wiederverbinden dieser Genabschnitte erlaubt die Synthese einer großen Vielfalt an Antikörpern. Abbildung 6.5 zeigt die Möglichkeiten der Kombination anhand von drei vorderen und drei hinteren Enden. Die Kombination ergibt neun verschiedene Gene. Angenommen, wir hätten 10 ver-



6.5 Modularer Aufbau von Genen

Durch die Verknüpfung von verschiedenen Genabschnitten wächst die Zahl der möglichen Kombinationen exponentiell mit der Zahl der zur Verfügung stehenden Abschnitte.

schiedene Anfangs-, Mittel- und Endsegmente, dann könnten diese zu $10 \times 10 \times 10 = 1000$ verschiedenen Varianten kombiniert werden. Diese Vorstellung ist dem realen Ablauf bei der Kombination von Antikörpergenen relativ ähnlich. Für die Herstellung von 1000 verschiedenen Proteinen sind nur 30 Segmente codierender DNA notwendig, die auf den Chromosomen gespeichert werden müssen.

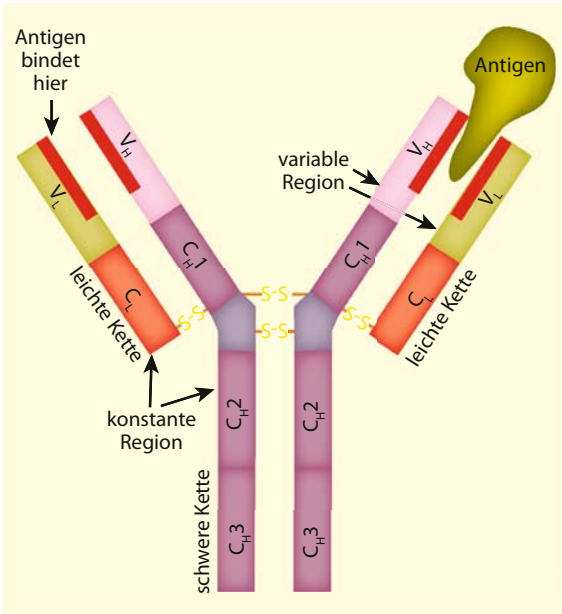
Die bemerkenswerte Wirtschaftlichkeit des Immunsystems steht in einem nahezu grotesken Kontrast zum Phänomen der *junk* DNA. In Säugern codieren in der Regel mehr als 95 % der DNA kein Protein. Das Immunsystem ist ein faszinierendes Beispiel dafür, wie große genetische Vielfalt durch Shuffling von relativ wenigen Abschnitten mit genetischer Information erzeugt werden kann. Tiere vermögen aus nur einigen Tausend Genabschnitten Milliarden von möglichen Antikörpern zu bilden.

Die Genetik der Antikörpervielfalt ist in ihren Details sehr komplex und wird in Lehrbüchern der Immunologie ausführlich beschrieben. Die übrigen Abschnitte dieses Kapitels gehen auf die Aspekte der Immunologie ein, die für die Biotechnologie von Bedeutung sind. Dazu gehören die Struktur von Antikörpern, die biotechnologische Veränderung von Antikörpern, die biotechnologischen Methoden, bei denen Antikörper eingesetzt werden, und schließlich die Impfstoffe. Am Ende des Kapitels gehen wir auf Methoden ein, die zur Identifizierung und Herstellung neuer Impfstoffe genutzt werden.

Antikörper sind in ihrer Struktur sehr vielfältig, sodass alle Pathogene erkannt werden können. Antikörper entstehen durch das Shuffling von Genabschnitten. Es gibt nicht für jeden Antikörper ein Gen.

Die Struktur eines Antikörpers

Jeder Antikörper besteht aus vier Proteinuntereinheiten, zwei **leichten Ketten** und zwei **schweren Ketten**, die die Form eines „Y“ annehmen (Abb. 6.6). Die Ketten werden durch Disulfidbrücken zwischen den Cysteinaminosäureresten zusammengehalten. Jede der leichten und schweren Ketten besteht aus einer **konstanten Region** und einer **variablen Region**. Die konstante Region ist bei allen Ketten der-



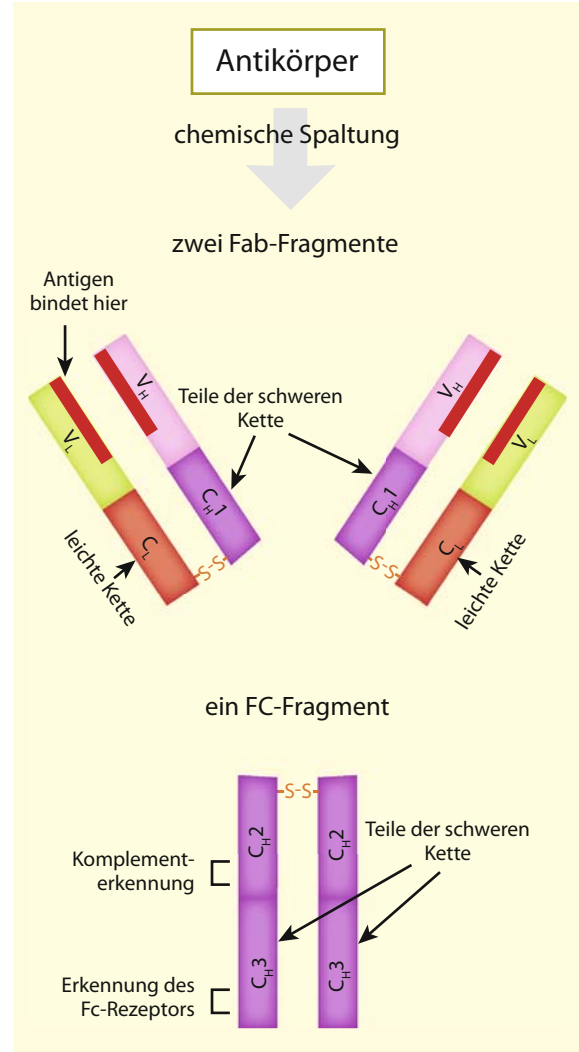
6.6 Struktur eines Antikörpers

Y-förmige Antikörper bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten. Jede unterteilt sich wiederum in Abschnitte: C_H1 , C_H2 und C_H3 sind die konstanten Regionen der schweren Kette; C_L ist die konstante Region der leichten Kette; V_H ist die variable Region der schweren Kette; V_L ist die variable Region der leichten Kette. Antigene binden an die variablen Regionen.

selben Klasse gleich. Die variable Region bindet an das Zielmolekül, das Antigen. Es gibt Millionen von verschiedenen variablen Regionen, die durch genetisches Shuffling entstehen.

Wird ein Antikörper am Gelenk (engl. *hinge*), an dem sich die schwere Kette biegt, gespalten, dann entstehen drei Stücke, zwei identische **Fab-Fragmente** und ein **Fc-Fragment** (Abb. 6.7). Fab (engl. *fragment, antigen binding*) besteht aus einer leichten Kette mit der Hälfte der schweren Kette, Fc (engl. *fragment, crystallizable*) enthält die unteren Hälften der beiden schweren Ketten. Andere Komponenten des Immunsystems erkennen und binden häufig die Fc-Region eines Antikörpers (s. unten).

Antikörper haben die Form eines „Y“. Das Gelenk (die gebogene Region) teilt das Molekül in zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Der Antikörper besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten.



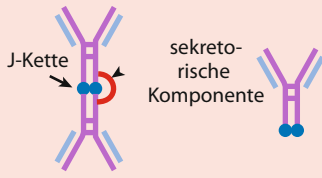


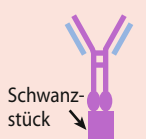
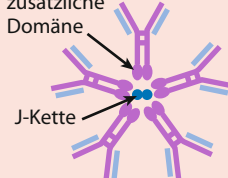

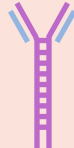
6.7 Fab-Fragmente und Fc-Fragment eines Antikörpers

Antikörper lassen sich in zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment teilen, indem das Molekül am Gelenk gespalten wird.

Struktur und Funktion von Immunglobulinen

Je nach Art der schweren Kette lassen sich Antikörper in verschiedene Klassen einteilen, die im Immunsystem unterschiedliche Funktionen übernehmen (Tab. 6.1). Beim häufigsten und typischsten Antikörper gehört die schwere Kette zur Klasse γ und man bezeichnet den Antikörper als **Immunglobulin G**.

Tabelle 6.1 Verschiedene Klassen und Funktionen von Antikörpern des Menschen

Antikörper	Subtyp	Leichte Kette	Schwere Kette	Struktur
IgA	IgA ₁	κ oder λ	α_1	 sekretorisch Monomer
	IgA ₂		α_2	
IgE	–	κ oder λ	ϵ	 zusätzliche Domäne
IgD	–	κ oder λ	δ	 Schwanzstück
IgM	–	κ oder λ	μ	 Schwanzstück Monomer
				 zusätzliche Domäne J-Kette Pentamer
IgG	IgG ₁	κ oder λ	γ_1	 IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₄
	IgG ₂	κ oder λ	γ_2	
	IgG ₃	κ oder λ	γ_3	
	IgG ₄	κ oder λ	γ_4	
				 IgG ₃

Anmerkung: Die leichten Ketten sind hellblau dargestellt, die schweren violett.

(IgG). IgG hat vier verschiedene Unterklassen. Insgesamt kommt diese Klasse hauptsächlich im Blutstrom vor; etwa 75 % der Antigene im Blutserum sind IgG-Moleküle. Diese stimulieren die Immunzellen entscheidend für die Aufnahme von eindringenden Pathogenen. IgG-Moleküle sind die einzigen Antikörper, die während der Schwangerschaft die Plazenta-schranke überwinden. Die zweite häufigste Klasse von

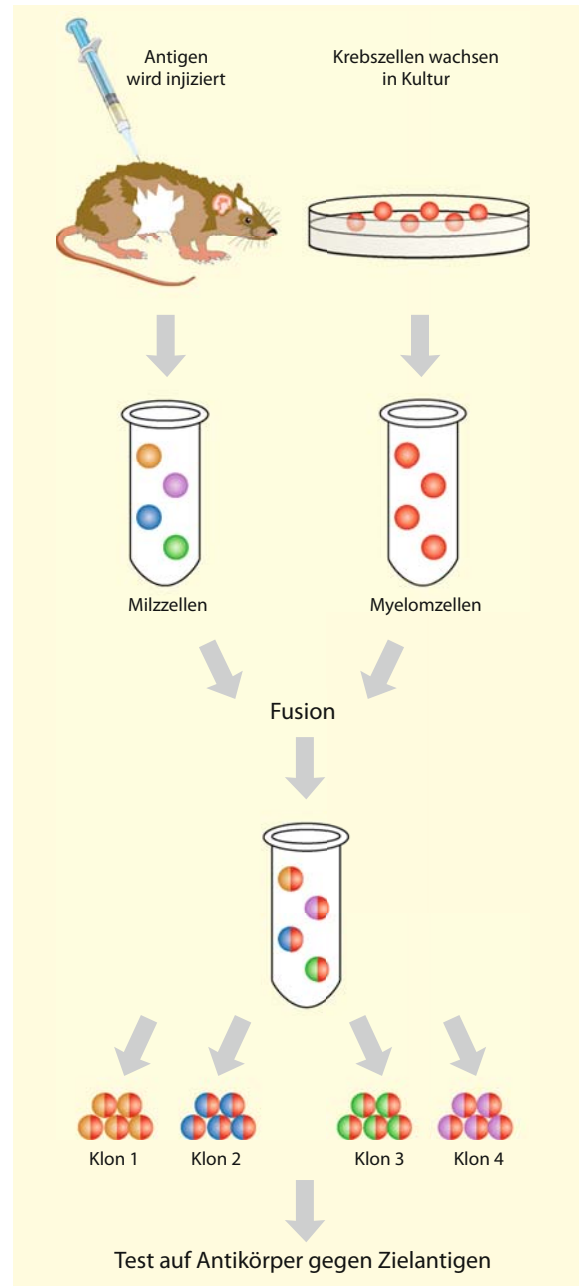
Antikörpern im Serum sind die sekretorischen Antikörper der Klasse IgA. Diese Antikörper kommen auch auf den Schleimhäuten, im Verdauungstrakt und in der Muttermilch vor. Insbesondere für Kinder sind diese Antikörper für die Abwehr von Infektionen der Atemwege und des Verdauungstraktes sehr wichtig, denn bei ihnen können Erkrankungen des Verdauungstraktes tödlich verlaufen. Die dritthäufigste

Klasse sind die IgM-Antikörper, die in der Regel in Form eines Pentamers vorliegen. Die ungewöhnliche Struktur von IgM bietet viele Bindungsstellen für Antigene (10 bei IgM gegenüber 2 bei IgG). Durch diese Struktur verklumpen Mikroorganismen nach der Bindung durch IgM-Antikörper, wodurch Immunzellen zum Abbau des gesamten Komplexes angeregt werden. IgD-Antikörper sind nur in geringen Mengen vorhanden und ihre Funktion ist noch nicht geklärt. IgE ist die seltenste Klasse und die Moleküle liegen in erster Linie an Mastzellen gebunden vor. IgE-Antikörper stimulieren allergische Reaktionen, indem sie zur Freisetzung von Histaminen führen, welche für die üblichen Allergiesymptome wie eine laufende Nase, Niesen und Husten verantwortlich sind.

Monoklonale Antikörper für klinische Zwecke

Für Antikörper gibt es viele medizinische Anwendungsmöglichkeiten. Sie werden für diagnostische Verfahren eingesetzt (wie ELISA, s. unten), für Schwangerschaftstests und für den Nachweis von Proteinen, die für bestimmte krankheitsauslösende Agenzien charakteristisch sind. In Zukunft werden sie möglicherweise verwendet, um Krebszellen oder Viren gezielt abzutöten. Für solche Zwecke ist eine relativ große Menge reiner Antikörper notwendig, die ein einzelnes Antigen spezifisch erkennen. Selbst wenn einem Tier im Tierversuch ein gereinigtes einzelnes Antigen injiziert wird, wird das Blutserum später ein Gemisch von Antikörpern gegen dieses Antigen enthalten. Es sei daran erinnert, dass ein einzelnes Antigen viele Epitope hat, sodass die Antikörper sowohl in ihrer Spezifität als auch in ihrer Affinität variieren. Man bezeichnet ein solches Gemisch als **polyklonale Antikörper**, weil die Antikörper von vielen verschiedenen B-Zell-Klonen synthetisiert werden, die alle das gleiche Antigen erkennen. Ein solches Gemisch ist für einen spezifischen Assay oder andere biotechnologische Methoden nicht besonders nützlich.

Sinnvoll ist, B-Zellen zu isolieren und zu kultivieren, die einen bestimmten Antikörper produzieren. Einen solchen Antikörper, der von einer einzelnen B-Zell-Linie synthetisiert wird, bezeichnet man als **monoklonalen Antikörper**. B-Zellen überleben jedoch auch unter hervorragenden Kulturbedingungen *in vitro* nur ein paar Tage. Die Lösung dieses Problems ist die Verwendung von Krebszellen. **Myelome** sind



6.8 Prinzip der Hybridomzellen

Monoklonale Antikörper stammen von einer einzelnen antikörperproduzierenden B-Zelle ab. Zunächst wird das Antigen in eine Maus injiziert, um eine Immunantwort auszulösen. Die Milz wird entnommen, da sie viele aktivierte B-Zellen enthält, doch überleben diese Zellen in Kultur nur für kurze Zeit; sie werden daher mit immortalen Myelomzellen fusioniert. Die Hybridomzellen werden einzeln kultiviert. Jeder Klon kann nun untersucht werden, um den Antikörper mit der höchsten und spezifischsten Affinität zum Zielprotein zu finden.

Tumore des Knochenmarks, die auch die B-Zellen betreffen. Diese wandeln sich zu Krebszellen, vermehren sich und exprimieren Immunglobulingene. Wie viele andere Tumorzellen, fahren Myelomzellen in Kultur mit der Vermehrung fort und teilen sich unbegrenzt, solange ausreichend Nährstoffe zur Verfügung stehen. Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern wird die relativ empfindliche B-Zelle, die den gewünschten Antikörper produziert, mit einer Myelomzelle fusioniert (Abb. 6.8). (Hierfür wird eine Myelomzelle, die ihre Fähigkeit zur Produktion von Antikörpern verloren hat, verwendet.) Die entstehende Hybridzelle bezeichnet man als **Hybridomzelle**; sie kann im Prinzip ewig in Zellkultur gehalten werden und wird den gewünschten Antikörper produzieren.

In der Praxis wird ein Tier, z.B. eine Maus, mit dem Antigen immunisiert, gegen das Antikörper benötigt werden. Hat die Antikörperproduktion ihren Höhepunkt erreicht, wird eine Probe von antikörpersezierierenden B-Zellen entnommen. Diese werden mit immortalen Myelomzellen fusioniert und es entsteht ein Gemisch aus vielen verschiedenen Hybridomzellen. Nun müssen die vielen einzelnen Hybridomzelllinien getestet werden, um eine zu finden, die die gewünschten antigenspezifischen Antikörper produziert. Diese Zelllinie wird anschließend kultiviert und liefert große Mengen monoklonaler Antikörper.

Monoklonale Antikörper erkennen nur ein Epitop eines Antigens und stammen von einer einzelnen B-Zelle ab.

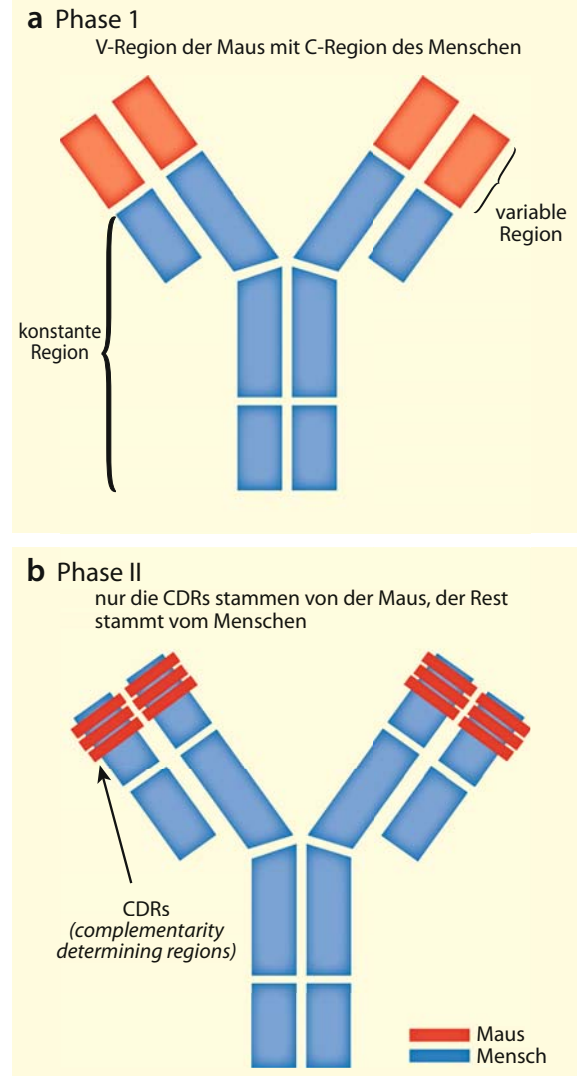
Die Fusion einer antigenstimulierten B-Zelle aus der Milz einer Maus mit einer Myelomzelllinie ergibt eine immortale Hybridomzelle. Für die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers wird jede dieser Zellen kultiviert und hinsichtlich ihrer Affinität zum ursprünglichen Antigen getestet.

Humanisierung von monoklonalen Antikörpern

Monoklonale Antikörper könnten eine Geheimwaffe im Kampf gegen Krebszellen sein. Für eine solche Anwendung wählt man Antikörper aus, die für Moleküle spezifisch sind, die ausschließlich auf der Oberfläche von Krebszellen vorkommen. Das menschliche Immunsystem erkennt jedoch Antikörper aus Mäusen oder anderen Tieren als fremde

Moleküle und versucht sie zu zerstören, und das ist ironischerweise das Hauptproblem.

Ein Ansatz zur Lösung des Problems könnte die Gentechnik sein, um die monoklonalen Antikörper zu **humanisieren** (Abb. 6.9a). Dabei nutzt man die Tatsache, dass nur die variable oder V-Region des



6.9 Humanisierung von monoklonalen Antikörpern

Antikörper aus der Maus lassen sich so verändern, dass sie einem humanen Antikörper ähnlicher werden. **a** Die gesamte konstante Region der schweren und leichten Kette kann durch konstante Regionen von humanen Antikörpern ersetzt werden. **b** Antikörper besitzen sechs CDRs, die die eigentliche Kontaktzone zwischen Antikörper und Antigen bilden. Der gesamte Antikörper, außer der CDR-Region, lässt sich durch die Sequenz aus dem Menschen ersetzen.

Antikörpers das Antigen erkennt; die konstante oder C-Region kann also ausgetauscht werden. Die zunächst (mit B-Zellen aus der Maus) hergestellte Hybridomzelle wird isoliert und kultiviert. Anschließend wird die DNA, die den monoklonalen Antikörper der Maus codiert, isoliert und kloniert. Die DNA für die konstante Region des Mausantikörpers wird durch den entsprechenden Bereich aus der humanen DNA-Sequenz ersetzt. Die V-Region bleibt jedoch unverändert. Das Hybridgen aus Mensch und Maus wird nun in eine zweite Myelomzelle eingebracht, die schließlich den Antikörper *in vitro* produziert. Obwohl nicht vollständig aus dem Menschen, enthält das Hybrid doch mehr humane Abschnitte und löst im menschlichen Immunsystem viel weniger Abwehrreaktionen aus als der ursprüngliche Antikörper aus der Maus.

Eine weiterreichende Humanisierung lässt sich erreichen, indem man die Abschnitte der V-Region verändert, die nicht direkt an der Bindung des Antigens beteiligt sind. Ein genauerer Blick auf die V-Region jeder Kette zeigt, dass die meisten Variationen auf drei kurze Abschnitte beschränkt sind, die auf der Oberfläche des Antikörpers Schleifen und so eine Antigenbindungsstelle ausbilden (s. Abb. 6.9b). Diese sind als hypervariable Bereiche oder **complementarity determining regions** (CDRs) bekannt. Insgesamt besteht jede Antigenbindungsstelle aus sechs CDRs, drei auf der leichten Kette und drei auf der schweren. Bei der vollständigen Humanisierung eines Antikörpers werden die codierenden Bereiche dieser sechs CDRs aus dem ursprünglichen Antikörper geschnitten und in menschliche Gene für die leichten und schweren Ketten kloniert.

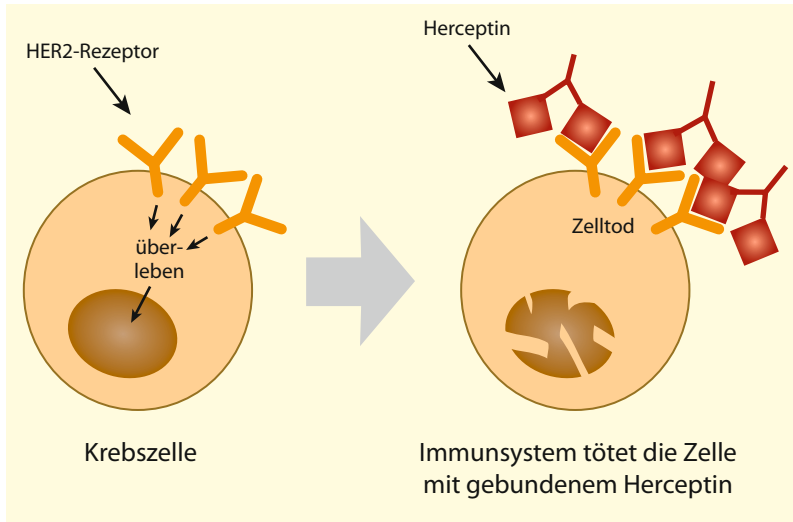
Humanisierte Antikörper werden hergestellt, indem man die konstanten Regionen des Antikörpers aus der Maus durch die konstanten Regionen eines humanen Antikörpers ersetzt. Das menschliche Immunsystem zeigt keine Abwehrreaktionen gegen diese Antikörper.

Humanisierte Antikörper in klinischen Anwendungen

Zurzeit sind viele verschiedene humanisierte monoklonale Antikörper in der Entwicklung, mit deren Hilfe eine Reihe von Erkrankungen behandelt werden sollen. Der erste dieser Antikörper, der für klinische

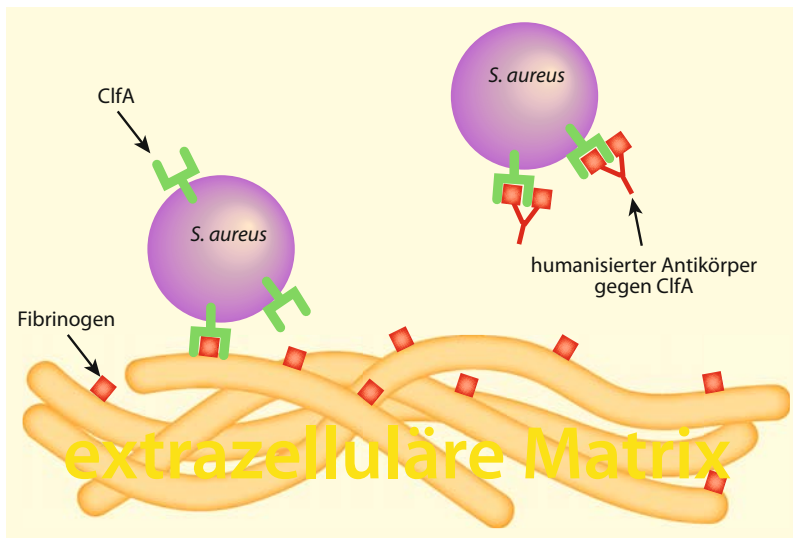
Anwendungen zugelassen wurde, ist Trastuzumab (**Herceptin**) für die Behandlung von Brustkrebs. Die Food and Drug Administration der USA ließ dieses Medikament im Jahr 1998 zu. Herceptin erkennt einen Oberflächenrezeptor einer Zelle, der als HER2 bezeichnet wird. Dieser Rezeptor ist Mitglied einer größeren Familie, zu der auch HER3, HER4 und das erste entdeckte Mitglied, der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR), gehören. Diese Rezeptoren bestimmen über eine Signalweiterleitung, an der eine Reihe von intrazellulären Proteinen beteiligt ist (welche die Genexpression modulieren), ob sich eine Zelle teilt, sich differenziert oder Selbstmord begeht. Bei Brustkrebspatientinnen, bei denen der HER2-Rezeptor übermäßig produziert wird, ist der Brustkrebs viel resistenter gegenüber einer Chemotherapie, als wenn die Expression auf normalem Niveau abläuft. Ein Überschuss an Rezeptormolekülen bei einer Patientin bedeutet daher eine schlechte Überlebensprognose. Herceptin bindet an die extrazelluläre Domäne von HER2 und verhindert, dass der Rezeptor von der Zelle internalisiert und abgebaut wird. Dadurch wird eine Teilung der Krebszelle verhindert, und das Immunsystem wird aktiviert und greift diese Zelle an (Abb. 6.10). Wird Herceptin in Kombination mit einer Chemotherapie eingesetzt, steigt die Überlebensrate der Patientin deutlich an. Herceptin bindet ein spezifisches Protein, daher müssen die Brustkrebszellen einen Überschuss an HER2 bilden, damit die Therapie erfolgreich ist.

Eines der häufigsten Probleme des heutigen Gesundheitssystems ist, das stationär behandelte Patienten erst im Krankenhaus an bakteriellen Infektionen erkranken. Diese **nosokomialen Infektionen** sind die Ursache für Tausende Todesfälle und kosten Milliarden Euro. Und noch bedenklicher ist die Tatsache, dass einige der verantwortlichen Krankheitserreger mittlerweile resistent gegen die meisten Antibiotika sind. Die Entwicklung eines humanisierten Antikörpers gegen eines der häufigsten bakteriellen Agenzien wird hoffentlich eine weitere Therapieform eröffnen. *Staphylococcus aureus* ist ein Bakterium, das schwere Infektionen verursacht. Man hat methicillinresistente Stämme identifiziert, die als MRSA (methicillinresistenter *S. aureus*) bezeichnet werden, und sogenannte VRSA, die vancomycinresistent sind. Methicillin und Vancomycin sind die effektivsten Antibiotika, die gegen *S. aureus* zur Verfügung stehen. Sind sie wirkungslos, dann verläuft die Infektion tödlich. Humanisierte monoklonale Antikörper gegen *S. aureus* wurden bereits auf ihre Effektivität getestet. Ein An-



6.10 Herceptin unterstützt das Abtöten von Krebszellen durch Bindung an HER2

Herceptin ist ein monoklonaler humanisierter Antikörper, der den HER2-Rezeptor auf Brustkrebszellen erkennt. Bindet der Antikörper an den Rezeptor, unterstützt das Immunsystem die Zerstörung der Krebszelle und die Zelle wird empfindlicher für eine Behandlung mit Chemotherapeutika.



6.11 Humanisierte Antikörper, die eine Besiedlung durch *S. aureus* verhindern

Antikörper gegen das Zelloberflächenprotein ClfA verhindern, dass *S. aureus* an ein Protein der extrazellulären Matrix, Fibrinogen, bindet. Findet diese Bindung nicht statt, dann können die Bakterien die Matrix nicht besiedeln und daher auch nicht infizieren.

Antikörper bindet an das ClfA-Protein (engl. *clumping factor A*), das auf der Zelloberfläche von *S. aureus* exprimiert wird. Das ClfA-Protein ist verantwortlich dafür, dass die Bakterien sich an Fibrinogen heften, ein Protein, das sich an der Oberfläche der Wirtszelle befindet. Bindet der Antikörper an ClfA, dann können sich die Bakterien nicht mehr an die Zelloberfläche lagern und somit auch nicht eindringen und die Zelle schädigen (Abb. 6.11). Die humanisierte Variante dieses Antikörpers wurde an Kaninchen getestet. Die Tiere wurden mit *S. aureus* infiziert und anschließend mit dem Antikörper behandelt. Verabreichte man zwei Dosen des Antikörpers, dann

war das Blut aller Kaninchen über 96 Stunden frei von Bakterien. Wurden die Tiere mit Vancomycin behandelt, dann waren nur etwa zwei Drittel der Blutkulturen negativ. Die klinischen Studien für die Verwendung des Antikörpers haben im März 2004 begonnen und dauern noch an.

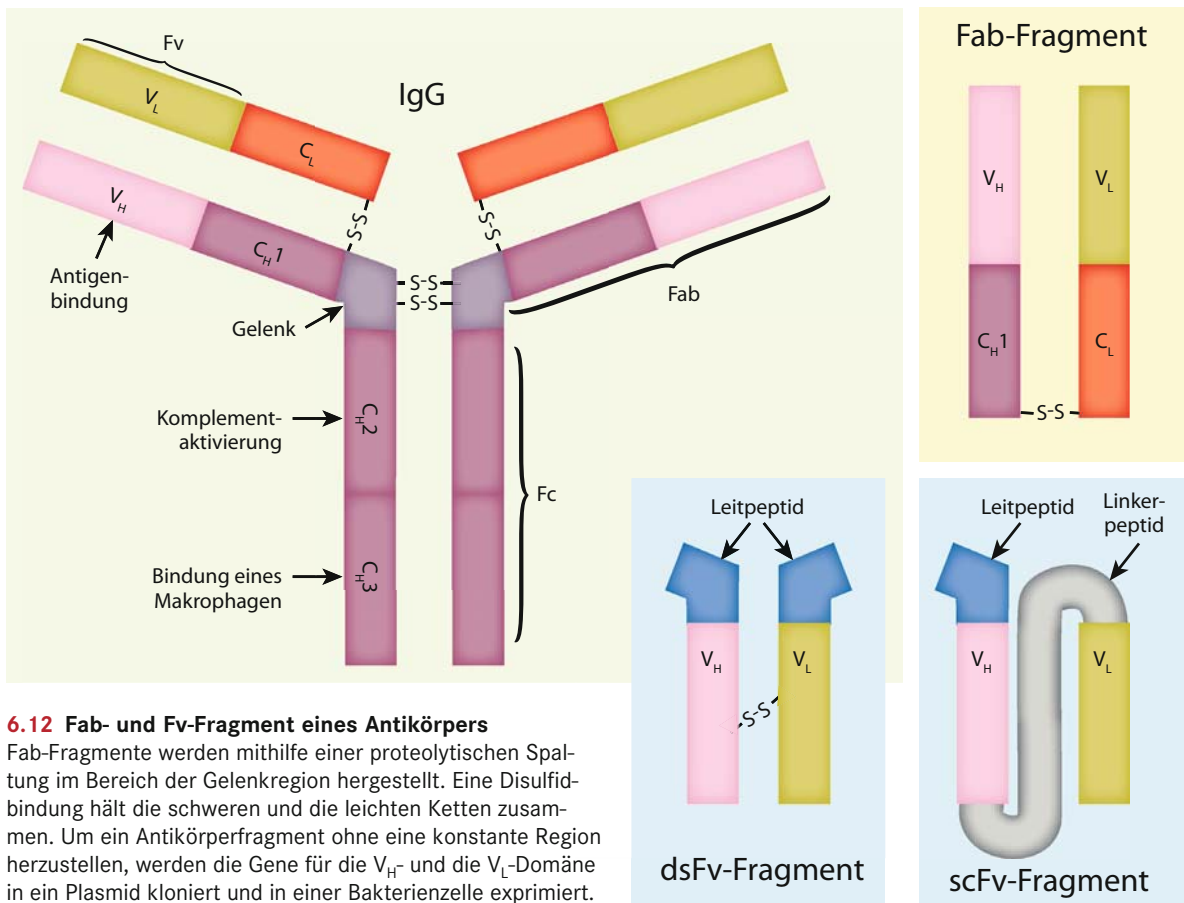
Der monoklonale Antikörper gegen HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor type 2*) hemmt die Teilung von Brustkrebszellen und wird bei Brustkrebspatientinnen zur Unterstützung der Therapie eingesetzt.

Gentechnische Veränderung von Antikörpern

Natürliche Antikörper bestehen aus einer Bindungsstelle für das Antigen und einer Effektorregion, welche für die Komplementaktivierung oder die Bindung der Immunzellen verantwortlich ist. Aus biotechnologischer Sicht ist die außerordentliche Spezifität, mit der Antikörper an ihr Zielprotein binden, für viele Anwendungen nützlich. Die gentechnische Veränderung von Antikörpern konzentriert sich daher auf die Antigenbindungsstelle des Antikörpers. Diese wird modifiziert und mit anderen Molekülfragmenten verknüpft.

Um eine Antigenbindungsstelle von dem restlichen Antikörper trennen zu können, werden die Genabschnitte, die die entsprechenden Bereiche

codieren, subkloniert und in Bakterien exprimiert. Bakterielle Signalsequenzen werden an den N-Terminus des Antikörpersegmentes gehängt, wodurch die Ketten in den periplasmatischen Raum transportiert werden. Hier werden die V_H - und V_L -Domänen korrekt gefaltet und die Disulfidbrücken ausgebildet. Zu den Antikörperfragmenten, die man verwendet, gehören Fab, Fv und **Einzelketten-Fv** (engl. *single-chain Fv*, **scFv**) (Abb. 6.12). Bei einem Fab-Fragment hält eine Disulfidbindung die beiden Ketten zusammen. In einem Fv-Fragment fehlt dieser Bereich jedoch, sodass das Fragment weniger stabil ist. Dies führte zu der Entwicklung eines Einzelketten-Fv-Fragmentes, bei dem die V_H - und V_L -Domänen durch ein kurzes Peptid miteinander verbunden sind, das in der Regel 15 bis 20 Aminosäuren lang ist. Dieses wird auf genetischer Ebene eingefügt, sodass die gesamte Struktur von einem einzelnen synthetischen



6.12 Fab- und Fv-Fragment eines Antikörpers

Fab-Fragmente werden mithilfe einer proteolytischen Spaltung im Bereich der Gelenkregion hergestellt. Eine Disulfidbindung hält die schweren und die leichten Ketten zusammen. Um ein Antikörperfragment ohne eine konstante Region herzustellen, werden die Gene für die V_H - und die V_L -Domäne in ein Plasmid kloniert und in einer Bakterienzelle exprimiert. Diese Struktur ist nicht stabil, da die Disulfidbrücken fehlen.

Eine Lösung für dieses Problem ist, beide Hälften so zu verändern, dass sie Disulfidbrücken erhalten (dsFv-Fragment), oder einen Linker einzufügen, der die V_H - und V_L -Domänen verbindet (scFv-Fragment).

Gen ausgehend exprimiert wird (V_H -Linker- V_L oder V_L -Linker- V_H). Häufig wird eine Tag-Sequenz (wie ein His6-Tag oder FLAG-Tag; s. Kap. 9) an das Ende gehängt, um den Nachweis und die Reinigung zu erleichtern. Ein scFv-Fragment ist mit einer Molekülmasse von 25 000 relativ klein.

Solche scFv-Fragmente werden mithilfe der Genmanipulation mit verschiedenen anderen Molekülen verknüpft. Die Funktion des scFv-Fragmentes besteht darin, ein Zielmolekül zu erkennen – vielleicht ein Protein, das ausschließlich auf der Oberfläche einer virusinfizierten Zelle oder einer Krebszelle exprimiert wird. Mit dem anderen Ende des Fragmentes lassen sich eine Vielzahl von Toxinen, Cytokinen oder Enzymen verbinden, die den aktiven Teil des rekombinanten Antikörpers darstellen. Grundsätzlich bietet dieser Ansatz die Möglichkeit, Therapeutika sehr gezielt verabreichen zu können. Zurzeit werden die Möglichkeiten zur klinischen Anwendung von gentechnisch veränderten Antikörpern untersucht.

Die Regionen zur Bindung des Antigens, die bei der gentechnischen Veränderung von Antikörpern genutzt werden, können aus charakterisierten monoklonalen Antikörpern stammen. Alternativ lässt sich auch aus einem Pool von B-Zellen eine Bibliothek aus DNA-Abschnitten herstellen, die V-Regionen codieren. Diese B-Zellen stammen aus einer Blutprobe eines Tiers oder des Menschen. Eine solche Bibliothek enthält in der Theorie V-Regionen, die alle zusammen genommen jedes Zielmolekül erkennen können. Werden die humanen B-Zellen herangezogen, dann umgeht man das oben beschriebene, aufwendige Verfahren der Humanisierung von Antikörpern. Die V-Region-Bibliothek wird nach einem Antikörperfragment durchsucht, welches das gewünschte Zielmolekül bindet. Dieses Screening kann mithilfe eines Phagen-Displays durchgeführt werden, das in Kapitel 9 beschrieben wird. Die Konstrukte der Bibliothek werden auf der Oberfläche eines Phagen exprimiert, das Zielmolekül wird an einen festen Träger gebunden und dazu verwendet, solche Phagen abzufangen, die die entsprechende V-Region tragen.

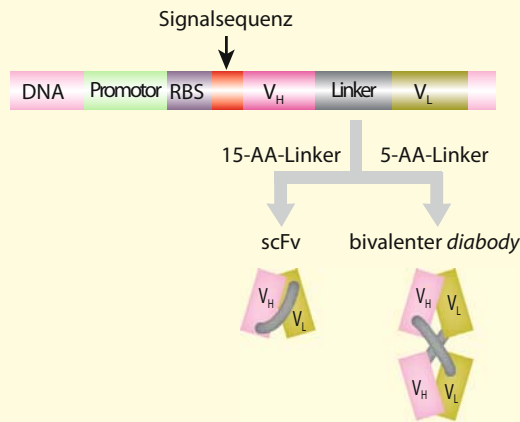
scFv-Fragmente der Bindungsregion eines Antikörpers werden an verschiedene Toxine, Cytokine oder Enzyme gebunden, sodass rekombinante Antikörper entstehen. Ein solcher Antikörper lässt sich einsetzen, um das an ihn gekoppelte Molekül zu einem Antigen zu transportieren, an welches das scFv-Fragment *in vivo* bindet.

Diabodies und bispezifische Antikörperkonstrukte

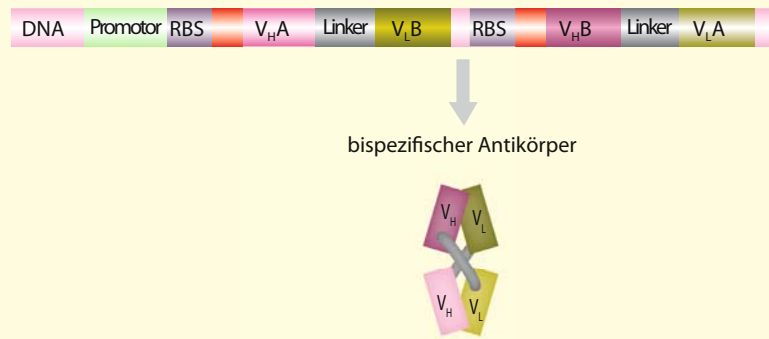
Zurzeit wird eine Vielzahl von gentechnisch hergestellten Antikörperkonstrukten untersucht. Ein **diabody** besteht aus zwei Einzelketten-Fv-(scFv-) Fragmenten, die miteinander verbunden sind. Die Kürzung des Linkers von 15 Aminosäuren auf fünf fördert die Dimerisierung der beiden scFv-Ketten. Dadurch ist eine Verbindung zwischen den V_H - und V_L -Domänen einer Kette nicht weiter möglich. Das Dimer besteht aus zwei scFv-Fragmenten, die über Kreuz angeordnet sind (Abb. 6.13). Der entstehende **diabody** besitzt zwei Antigenbindungsstellen, die in entgegengesetzte Richtungen weisen. Werden zwei verschiedene scFv-Fragmente eingesetzt, entsteht ein bispezifischer Antikörper, der gleichzeitig zwei verschiedene Zielproteine binden wird. Für die Herstellung eines solchen bispezifischen Antikörpers ist es notwendig, dass V_HA mit V_LB verknüpft wird und V_HB mit V_LA . Beide Sätze von V_H - und V_L -Regionen lassen sich in einer einzigen Polypeptidkette, die von einem einzigen rekombinanten Gen codiert wird, miteinander kombinieren, wie Abbildung 6.13 zeigt. Bispezifische Antikörper bieten ein weites Feld möglicher Einsatzgebiete in der Therapie, weil sie genutzt werden können, um zwei Moleküle miteinander zu verbinden. Sie lassen sich z.B. verwenden, um Toxine gezielt zu Krebszellen zu transportieren.

Eine weitere Möglichkeit, einen bispezifischen Antikörper herzustellen, ist, die beiden verschiedenen scFv-Fragmente mit anderen Proteinen zu koppeln, die aneinander binden (Abb. 6.14). Zwei bekannte Proteine bzw. Strukturen, die sich hier einsetzen lassen, sind **Streptavidin** und der Leucin-Zipper. Streptavidin ist ein kleines, biotinbindendes Protein aus *Streptococcus*-Bakterien. Es bildet Tetramere, sodass mit seiner Hilfe vier Antikörperfragmente miteinander verbunden werden können. Außerdem lassen sich die Konstrukte über die Bindung an eine Biotinsäule aufreinen. Leucin-Zipper-Regionen sind Bestandteil vieler Transkriptionsfaktoren, die Dimere bilden (s. Kap. 2). Häufig bilden solche Proteine gemischte Dimere, wenn ihre Leucin-Zipper einander erkennen und sich zusammenlagern. Leucin-Zipper von zwei verschiedenen, assoziierenden Transkriptionsfaktoren (z.B. die Proteine Fos und Jun), lassen sich daher nutzen, um zwei verschiedene scFv-Fragmente aneinander zu koppeln.

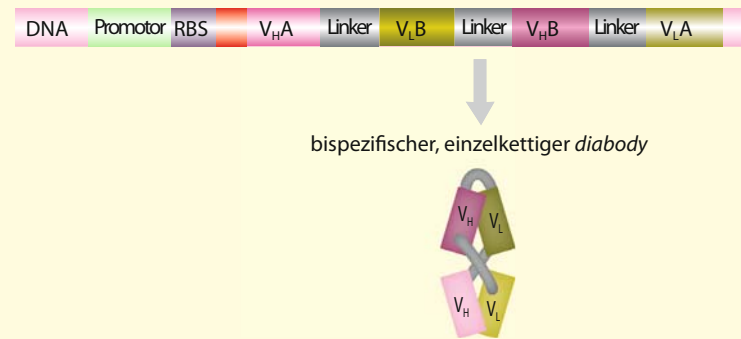
a



b

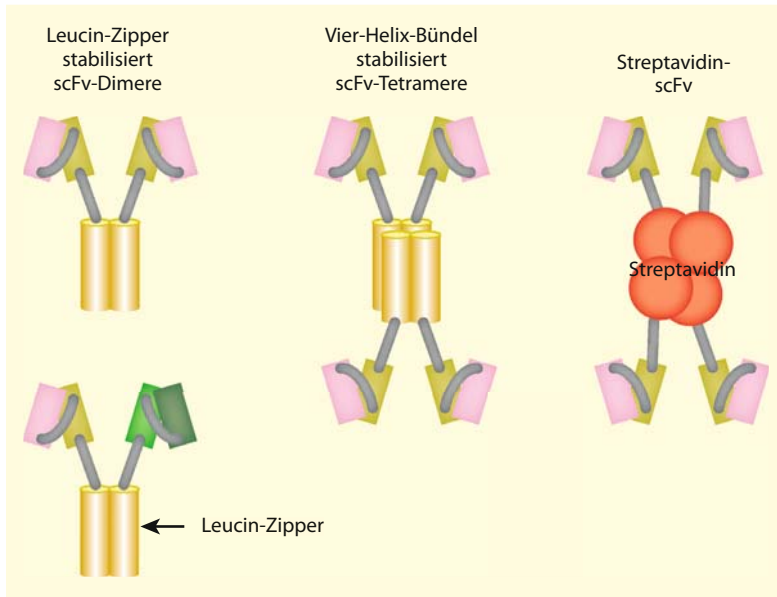


c



6.13 Gentechnisch veränderte *diabody*-Konstrukte

a Die gentechnische Veränderung eines *diabody*-Konstruktes beginnt mit der Fusion der variablen Domänen der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) mit einem Linker auf Ebene der DNA. Durch den langen Linker entsteht eine einzelne Antigenbindungsdomäne, durch den kürzeren Linker können sich zwei Polypeptide mit zwei Bindungsdomänen zu einem Komplex aneinanderlagern. Ein bakterieller Promotor und eine RBS (Ribosomenbindungsstelle) erlauben die Expression des Konstruktes in Bakterien. Die Signalsequenz sorgt für eine Sekretion des veränderten Proteins. **b** Statt identischer Fv-Einheiten lassen sich auch zwei verschiedene Fv-Ketten coexprimieren. Die beiden Fv-Ketten vereinigen sich zu einem *diabody* mit zwei verschiedenen Antigenbindungsdomänen, auf jeder Seite eine andere. **c** Aus einem Transkript mit einem Linker zwischen V_HA und V_LB , einem Linker zwischen den beiden Hälften und einem Linker zwischen V_HB und V_LA lassen sich bispezifische Antikörper herstellen.



6.14 Gentechnisch hergestellte, bispezifische Antikörper

Statt genetischer Linker, die die Hälften von *diabodies* zusammenhalten, können auch zwei verschiedene Proteine die beiden scFv-Fragmente miteinander verbinden. So dimerisieren Proteine mit einer Leucin-Zipper-Domäne; werden scFv-Gene genetisch mit den DNA-Abschnitten für diese Proteine gekoppelt, dann dimerisieren die scFv-Fragmente über die Leucin-Zipper-Bereiche. Proteine wie Streptavidin oder Proteine mit einer Vier-Helix-Bündel-Domäne lassen sich auf DNA-Ebene mit scFv-Domänen fusionieren. Wird dieses Gen exprimiert, dann befinden sich vier scFv-Domänen auf der Außenseite und bilden vier verschiedene Bindungsstellen für Antigene.

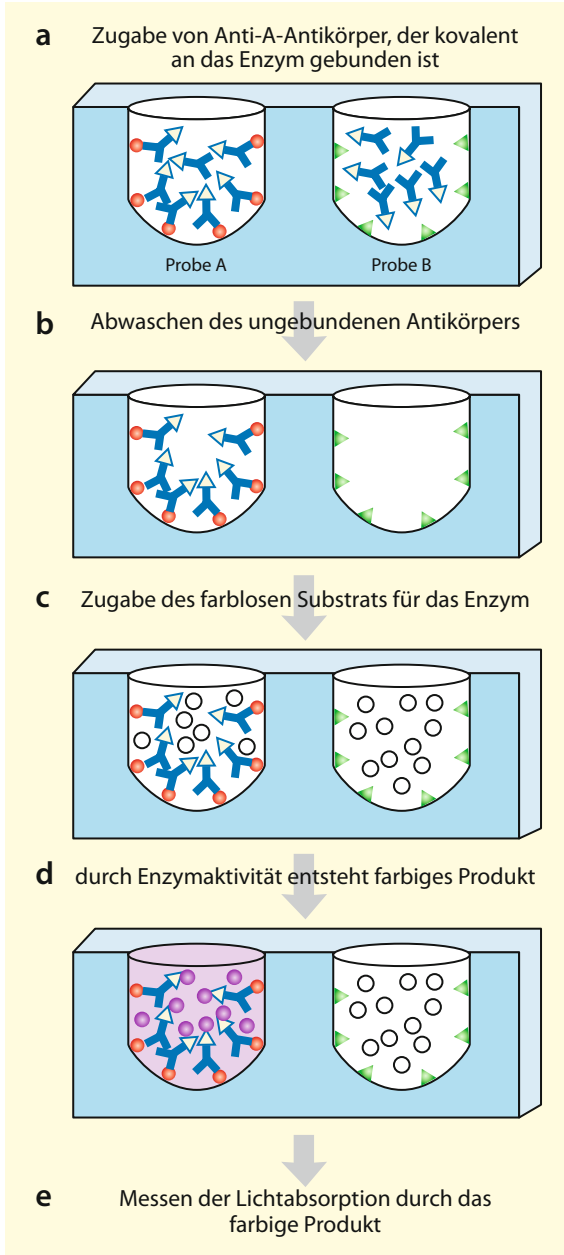
Durch die Kopplung von zwei scFv-Fragmenten über ihre Linker-Regionen oder über Proteine (z.B. Streptavidin oder Proteine mit Leucin-Zipper) lassen sich bivalente Antikörper herstellen, d.h., jede Seite des Antikörpers erkennt ein anderes Antigen. Diese Konstrukte sind nützlich, wenn zwei verschiedene Proteine in der Zelle in enge Nachbarschaft gebracht werden sollen.

ELISA-Assay

Der **ELISA** (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein häufig eingesetztes Verfahren, um ein Protein in einer Probe spezifisch nachzuweisen und seine Konzentration zu ermitteln. Das nachzuweisende Protein spielt dabei die Rolle eines Antigens. Der erste Schritt ist daher, einen Antikörper herzustellen, der für das Zielprotein spezifisch ist. An diesen Antikörper wird nun ein Nachweissystem gekoppelt, das in der Regel aus einem Enzym besteht, welches ein farbloses Substrat zu einem farbigen Produkt umsetzt. Ein Beispiel ist die Alkalische Phosphatase, die X-Phos in einen blauen Farbstoff umwandelt (s. Kap. 8). Die Proben, die analysiert werden sollen, werden auf der Oberfläche einer

Membran oder in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert (Abb. 6.15). Der Antikörper mit dem daran gekoppelten Nachweissystem wird zugegeben und bindet an das Protein. Die Membran bzw. Mikrotiterplatte wird nun gewaschen, um ungebundene Antikörpermoleküle zu entfernen. Anschließend gibt man das Substrat zu und die Intensität des entstehenden Farbstoffes zeigt die Menge an Zielprotein an.

Von dem ELISA gibt es eine Vielzahl von Modifikationen. Häufig werden Bindung und Nachweis in zwei Schritten durchgeführt, indem man zwei verschiedene Antikörper verwendet. Der erste Antikörper ist spezifisch für das Zielprotein. Der zweite Antikörper erkennt den ersten und trägt das Nachweissystem. So lassen sich in Kaninchen Antikörper gegen verschiedene Zielproteine herstellen. Der zweite Antikörper, der die Antikörper aus Kaninchen erkennt, kann aus Schafen stammen. Man nennt sie sekundäre Antikörper, und sie tragen beispielsweise die Bezeichnung *sheep anti-rabbit*. Der sekundäre Antikörper trägt das Nachweissystem, und da er jeden Antikörper erkennt, der in Kaninchen hergestellt wurde, muss er nicht für jedes neue Zielprotein angepasst und neu synthetisiert werden. Es ist daher möglich, für jeden Assay den gleichen sekundären Antikörper zu verwenden, selbst wenn die primären Antikörper spezifisch für verschiedene Proteine sind.



6.15 Grundlagen eines ELISA-Assays

Ein ELISA-Assay detektiert ein Protein, das in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte gebunden ist, und quantifiziert dessen Menge. Der Anti-A-Antikörper ist, an ein Enzym wie die Alkalische Phosphatase gekoppelt. Er erkennt nur das orangefarbene Protein und nicht das grüne. **a** Nachdem der Antikörper an das Zielmolekül gebunden hat, werden ungebundene Antikörpermoleküle von der Platte gewaschen. **b** In jede Vertiefung wird ein Substrat der Alkalischen Phosphatase gegeben (**c**), das durch das Enzym in ein farbiges, kolorimetrisch nachweisbares Produkt gespalten wird (**d**). Die Farbintensität ist proportional zur Proteinmenge.

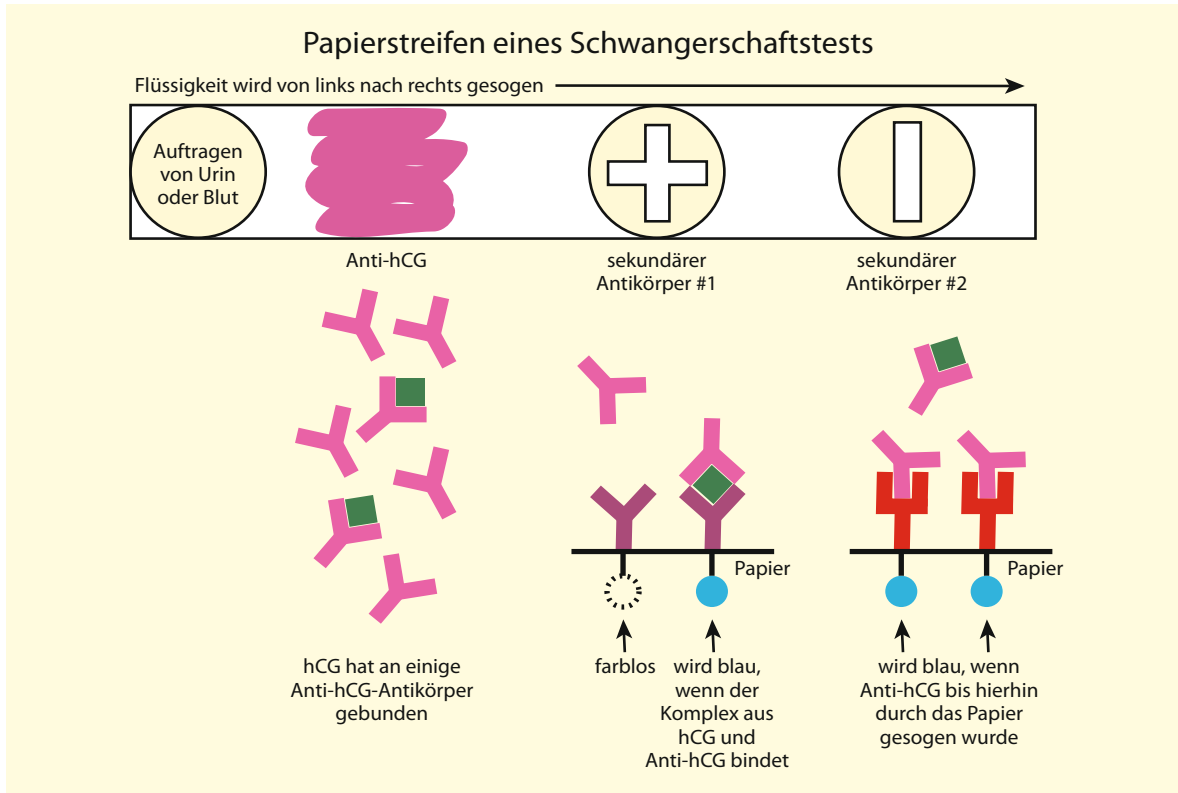
In ELISA-Assays werden Antikörper eingesetzt, um die relative Konzentration des Zielproteins oder Antigens in einer Probe zu ermitteln.

Der primäre Antikörper ist der Antikörper, der das Zielprotein oder Antigen erkennt. Der sekundäre Antikörper erkennt einen Antikörper, der in Schaf, Kuh, Kaninchen, Ziege oder Maus synthetisiert wurde.

Der ELISA als Werkzeug zur Diagnose

Der ELISA wird in vielen verschiedenen Bereichen eingesetzt. Für die klinische Diagnose von Erkrankungen des Menschen, Erkrankungen bei Milchkühen und Geflügel und sogar für Pflanzenkrankheiten sind diagnostische Kits im Einsatz. Die Kits sind so einfach zu verwenden, dass dafür meist keine Laborausstattung notwendig ist und die Anwendung weniger als fünf Minuten dauert. Wird ein ELISA-Kit für den Nachweis einer Pflanzenkrankheit eingesetzt, wird ein Blatt zunächst zerdrückt und der Blattbrei auf den Antikörper gegeben. Bindet das gewebespezifische Antigen an den Antikörper, dann verfärbt sich das Feld mit dem Antikörper blau. Bei klinischen Anwendungen vermögen ELISA-Kits winzige Mengen eines pathogenen Virus oder Bakteriums nachzuweisen, noch bevor das Pathogen den Körper schädigen konnte. ELISA-Kits für klinische Anwendungen weisen verschiedene, für eine Erkrankung typische Proteine nach. Bei bestimmten Krankheiten kennzeichnen charakteristische Proteine den Beginn, lange noch bevor der Patient Symptome entwickelt. Der Nachweis solcher Markermoleküle unterstützt die Diagnose und die Krankheit kann noch vor dem Auftreten massiver Schäden behandelt werden.

Der diagnostische Einsatz des ELISAs ist sogar für den Hausgebrauch geeignet. Schwangerschaftstests sind einfache ELISA-Assays, die das **humane Choriongonadotropin (hCG)** nachweisen. Dabei handelt es sich um ein Protein, das von der Plazenta gebildet und in den Blutstrom und den Urin der Schwangeren sekretiert wird. Der Schwangerschaftstest hat vier wichtige Merkmale (Abb. 6.16). Erstens befindet sich der gesamte Test auf einem Papierstreifen, durch den der Urin von einem Ende zum anderen gesogen wird. Der Streifen ist in drei Bereiche unterteilt: eine Region, in der der Anti-hCG-Antikörper locker an das Papier gebunden ist, eine zweite Region, die



6.16 Schwangerschaftstests sind diagnostische Werkzeuge auf Basis eines ELISAs

Der hier dargestellte Schwangerschaftstest unterteilt sich in vier Felder. Urin oder Blut werden auf dem am weitesten links liegenden Punkt aufgetragen und nach rechts durch das Papier gesogen. Enthält der Urin hCG, dann bindet das Molekül an seinen Antikörper und wandert als Komplex im Papier. Im nächsten Feld befindet sich der sekundäre Antikörper, der nur den Komplex aus hCG und primärem Antikörper erkennt und in Form eines Pluszeichens auf dem Papier fixiert ist. Bindet der Komplex an den sekundären Antikörper, verfärbt sich das Nachweissystem blau. Im letzten Feld ist ein anderer sekundärer Antikörper fixiert, der den primären ohne hCG erkennt. Dies ist eine Positivkontrolle, um sicherzustellen, dass der Antikörper tatsächlich freigesetzt und mit dem Urin durch das Papier gesogen wurde.

als Schwangerschaftsfenster bezeichnet wird, und schließlich ein Kontrollfenster. Wenn der Urin von dem Papierstreifen aufgenommen wird, binden die im Fall einer Schwangerschaft vorhandenen hCG-Moleküle an Anti-hCG-Antikörper und bilden einen Komplex. Dieser Komplex wird dann durch das Papier gesogen. Liegt keine Schwangerschaft vor, wandert nur der Anti-hCG-Antikörper durch das Papier. (Auch bei einer Schwangerschaft wandern nichtkomplexe Anti-hCG-Antikörper, denn der Antikörper liegt im Vergleich zum hCG-Molekül im Überschuss vor.) Der Anti-hCG/hCG-Komplex (bei einer Schwangerschaft) erreicht das Schwangerschaftsfenster, wo er an den sekundären Antikörper 1 bindet. Dieser ist bei manchen Tests in Form eines „+“ auf dem Papier fixiert und diffundiert nicht. Er ist mit einem Nachweissystem

gekoppelt. Durch die Bindung des Komplexes an den sekundären Antikörper wird ein Farbstoff freigesetzt, und das Pluszeichen wird sichtbar. Das Kontrollfenster enthält den sekundären Antikörper 2. Dieser erkennt nur den Anti-hCG-Antikörper, der nicht an hCG gebunden ist. Hier findet unabhängig von einer Schwangerschaft eine Farbreaktion statt.

Der ELISA stellt ein vielseitiges und leistungsfähiges Werkzeug für die Diagnose dar, weil gegen nahezu jedes Protein Antikörper hergestellt werden können. Bei einem Schwangerschaftstest binden hCG-Moleküle aus dem Urin an Anti-hCG-Antikörper, die wiederum an einen immobilisierten sekundären Antikörper binden, an den ein Nachweissystem gekoppelt ist.

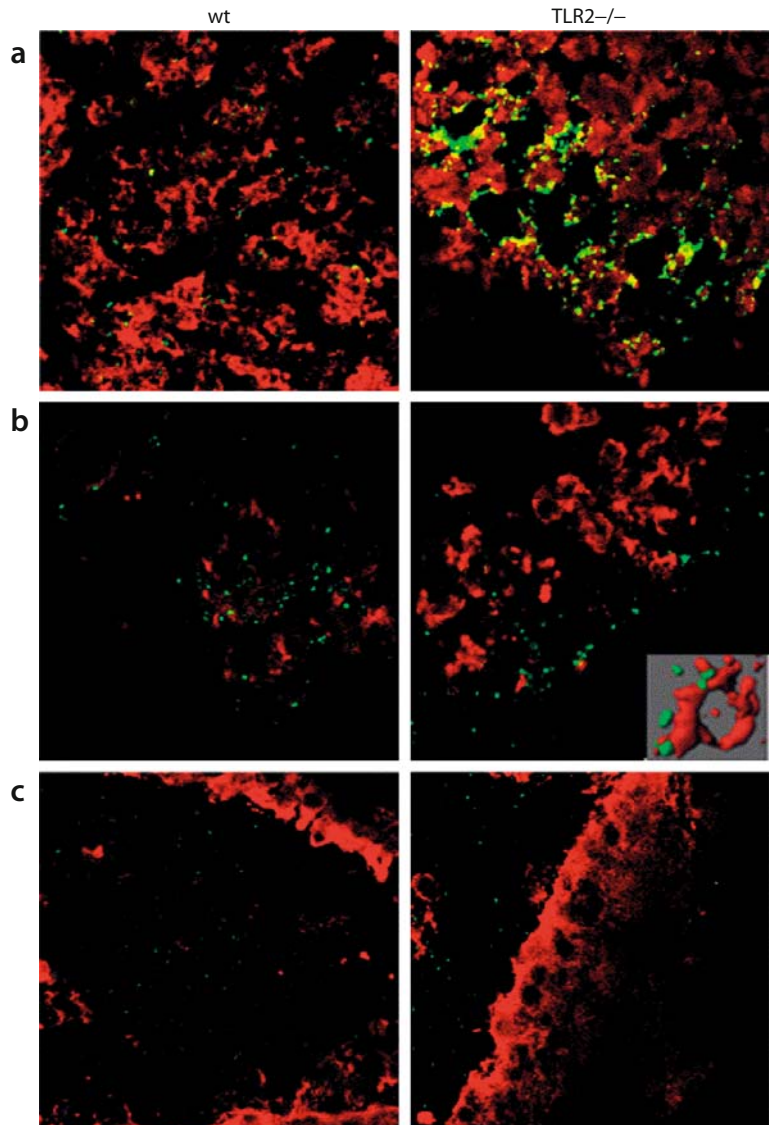
Sichtbarmachung von Zellbestandteilen mithilfe von Antikörpern

Mithilfe von Antikörpern lässt sich auch ein bestimmtes Protein in der Zelle sichtbar machen. Durch die **Immunocytochemie** werden Antigene in kultivierten Zellen spezifisch lokalisiert. Die **Immunhistochemie** untersucht dagegen Gewebeschnitte. Der erste Schritt ist bei beiden Verfahren die Präparation der Zellen. Damit ihre zelluläre Struktur nicht verloren geht, müssen sie besonders behandelt werden.

Dass Struktur und Gestalt der lebenden Zellen während der Präparation erhalten bleiben, erreicht man durch den Einsatz quervernetzender Chemikalien wie Formaldehyd oder denaturierender Agenzien wie Aceton oder Methanol. In der Immunhistochemie können auch tiefgefrorene Gewebeproben verwendet werden, die in dünne Scheiben mit einer Dicke von etwa 4 nm geschnitten, ein zweidimensionales Bild einer Zelle ergeben. Eine weitere Möglichkeit ist, die Gewebeprobe in Paraffin einzubetten. Dabei werden die Zellen durch eine Reihe alkoholischer Lösungen zunächst entwässert und dann mit dem Wachs behandelt. Es folgt der Dünnschnitt wie bei dem gefrorenen Gewebe.

6.17 Markierung mit einem fluoreszierenden Antikörper

Die Colokalisierung von *Streptococcus pneumoniae* und membranspezifischen Antigenen in Gewebeschnitten des Mausgehirns mithilfe eines konfokalen Lasermikroskops bei 63facher Vergrößerung. Die Bakterien exprimieren GFP und erscheinen grün. Alle drei Antigene wurden durch einen rot fluoreszierenden Farbstoff getrennt voneinander sichtbar gemacht. Gelbe Bereiche zeigen an, dass Bakterien und membranspezifische Antigene an der gleichen Stelle lokalisiert sind. Auf der linken Seite handelt es sich um Gewebe von Wildtypmäusen, auf der rechten Seite um solches von Mäusen, denen der *toll like*-Rezeptor 2 fehlt. **a** GLT1v-gefärbte Epithelzellen des Plexus choroideus im Gehirn. **b** Dritter Ventrikel mit infiltrierenden, Gr-1-gefärbten Granulocyten. (Kleines Bild: 3-D-Aufnahme von Bakterien, die von Granulocyten aufgenommen wurden.) **c** Dritter Ventrikel und GFAP-gefärbte Astrocyten. Aus Echchannaoui et al (2005) Regulation of *Streptococcus pneumoniae* distribution by Toll-like receptor 2 *in vivo*. Immunobiology 210: 229–236. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.



Die konservierten und wasserabweisenden Schnitte müssen anschließend behandelt werden, damit das Antigen für den Antikörper zugänglich wird. Sind die Schnitte in Paraffin eingebettet, werden sie entwacht und rehydriert. Fixierte Gewebeschnitte können mit Mikrowellen behandelt werden, die die Quervernetzungen des Fixativs wieder lösen, oder die Proben werden unter Druck erhitzt. Nach diesem Permeabilisierungsschritt kann der primäre Antikörper das Antigen in der Probe binden. Das Nachweissystem ist an den sekundären Antikörper gekoppelt. Dieser bindet an den Komplex aus primärem Antikörper und Antigen, und schließlich gibt man die entsprechenden Reagenzien hinzu, um den Komplex sichtbar zu machen und zu lokalisieren. (In manchen Fällen wird auch ein primärer Antikörper eingesetzt, an den ein Nachweissystem gekoppelt ist.)

Der Antikörper wird durch Enzyme oder einen gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen. Ein vielfach verwendetes, enzymvermitteltes Nachweisverfahren nutzt die Alkalische Phosphatase, die auch bei einem ELISA eingesetzt wird (s. Abb. 6.15). Fluoreszenzmarkierte Antikörper müssen mit UV-Licht angeregt werden, woraufhin der Fluoreszenzfarbstoff Licht einer höheren Wellenlänge emittiert. Die Proben lassen sich mit dem Mikroskop, das eine UV-Lampe besitzt, untersuchen (Abb. 6.17). Unter starker UV-Strahlung neigt der Fluoreszenzfarbstoff jedoch zum Ausbleichen. Daher ist am Mikroskop eine Kamera montiert, die Bilder aufnimmt und digitalisiert.

Bei Immunocytochemie und Immunhistochemie werden primäre Antikörper eingesetzt, die an ein spezifisches zelluläres Zielprotein binden, sodass es sich innerhalb der Zelle lokalisieren lässt. Der primäre Antikörper wird mithilfe eines sekundären Antikörpers und eines daran gekoppelten Nachweissystems sichtbar gemacht.

Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

Wie im vergangenen Abschnitt beschrieben, lassen sich fluoreszenzmarkierte Antikörper nutzen, um intrazelluläre Proteine zu lokalisieren. Diese Antikörper binden jedoch auch Oberflächenantigene. Viele Zellen des Immunsystems tragen spezifische Antigene auf ihrer Oberfläche und unterscheiden sich so vonei-

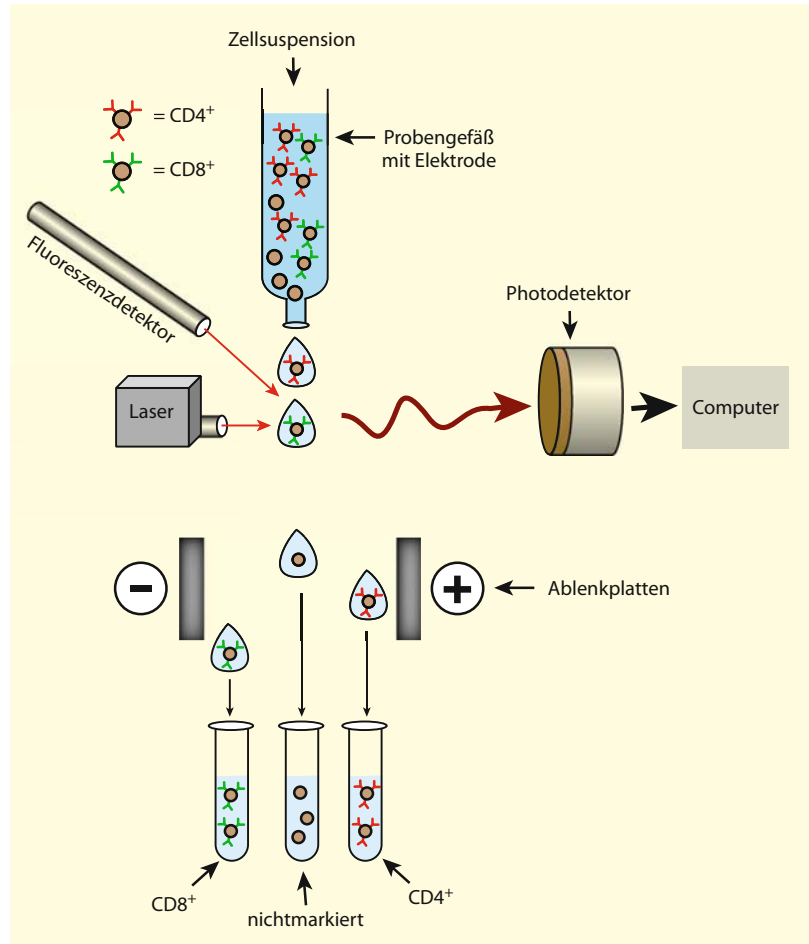
ander. Auf der Oberfläche einer Immunzelle können sich über 100 000 Antigenmoleküle befinden. Diese Oberflächenantigene charakterisieren die verschiedenen Typen von Immunzellen und bilden unterschiedliche Differenzierungscluster, von denen jeder, in der Reihenfolge der Entdeckung, eine Nummer erhielt (engl. *cluster of differentiation antigen*, **CD-Antigen**). Die Antigene wurden meist entdeckt, bevor ihre physiologische Funktion bekannt wurde. So sind die CD4-Antigene mit T-Helferzellen assoziiert und CD8 mit T-Killerzellen. Mittlerweile stehen monoklonale Antikörper zur Verfügung, mit denen sich viele verschiedene CD-Antigene markieren lassen.

Die **fluoreszenzaktivierte Zellsortierung** (engl. *fluorescence activated cell sorting*, **FACS**) ist ein Verfahren für die Auftrennung von Zellen eines Gemisches anhand ihrer Oberflächenantigene (Abb. 6.18). Da der Antikörper an die Außenseite der Zelle bindet, muss diese nicht wie oben beschrieben präpariert werden. In diesem Beispiel lassen sich T-Helferzellen und T-Killerzellen von anderen weißen Blutzellen trennen, da auf ihrer Oberfläche CD4 bzw. CD8 exprimiert werden. Zunächst wird die Zellsuspension mit monoklonalen Antikörpern gegen die gewünschten Oberflächenantigene markiert. In diesem Beispiel sind es Antikörper gegen CD4 und CD8, an die jeweils ein anderer Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die auf diese Weise markierte Zellsuspension wird in ein Probengefäß gegeben und elektrisch aufgeladen. Unter Druck treten durch eine Düse am Boden des Gefäßes Flüssigkeitstropfen aus, die jeweils nur eine Zelle enthalten. Die Tropfen passieren einen Laserstrahl, der den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Ein Fluoreszenzdetektor misst das Fluoreszenzlicht und die Signale werden elektronisch weiterverarbeitet. Die Tropfen passieren zwei Ablenkplatten, die sie, je nach Farbe der Fluoreszenz, in eines der Sammelgefäße ablenken. Enthält der Tropfen kein Antigen, dann wird er auch nicht abgelenkt. In der Regel verwendet man zwei verschiedene Antikörper, doch einige neuere FACS-Geräte binden bis zu 12 unterschiedliche, fluoreszenzmarkierte Antikörper und sortieren bis zu 300 000 Zellen pro Sekunde.

Durchflusscytometrie ist ein ähnliches Verfahren für die Analyse fluoreszenzmarkierter Zellen. Wie bei FACS werden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene markiert. Die Antikörper sind mit einer Vielzahl unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert, und jeder Antikörper wird anhand seiner Fluoreszenz nachgewiesen. Die Zellen werden elektrisch aufgeladen und in kleinen Tröpfchen getrennt. Bei der Durch-

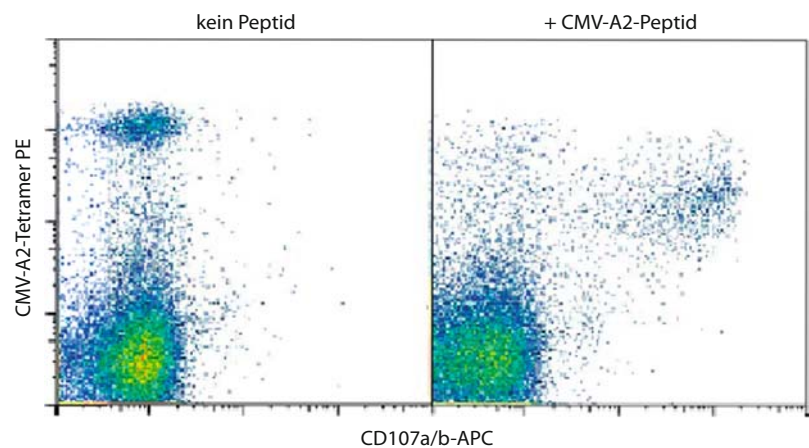
6.18 Mithilfe von FACS lassen sich CD4⁺- und CD8⁺-Zellen voneinander trennen

FACS-Geräte können fluoreszenzmarkierte Zellen voneinander trennen. In diesem Beispiel handelt es sich um ein Gemisch aus CD4⁺-, CD8⁺- und nichtmarkierten Zellen. Registriert der Fluoreszenzdetektor eine grüne Fluoreszenz, dann ziehen die geladenen Ablenkplatten den Tropfen nach links bzw. zur negativ geladenen Platte, und die Tropfen mit den entsprechenden Zellen werden in dem linken Gefäß gesammelt. Fluoreszieren die Zellen nicht, dann fällt der Tropfen in das mittlere Gefäß. Ist die Fluoreszenz rot, dann ziehen die Ablenkplatten den Tropfen nach rechts, wo er ebenfalls in einem Gefäß aufgefangen wird.



6.19 Daten einer Durchflusszytometrie

Die Expression von Proteinen auf der Oberfläche von weißen Blutzellen. Weiße Blutzellen werden mit einem MHC-Klasse-I-Tetramer und einem Anti-CD107-Antikörper, an den APC (Allophycocyanin, blau) gekoppelt ist, gefärbt und wie folgt behandelt: (Links) Färbung mit Anti-CD3, markiert mit Phycoerythrin (rot) und Anti-CD8, markiert mit Peridininchlorophyllprotein (grün); Analyse ohne weitere Inkubation. (Rechts) Färbung nach Stimulation mit dem spezifischen Peptid (NLV-PMVATV). Aus: Betts et al (2003) Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281: 65–78. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.



flusscytometrie werden sie jedoch nicht sortiert und gesammelt; stattdessen wird die Probe gemessen und dann verworfen. Passieren die Zellen den Detektor, wird die Fluoreszenz registriert und ein Computer stellt die Zahl der Zellen mit einem bestimmten Fluoreszenzsignal in einer Grafik dar, in der jeder Punkt eine Zelle repräsentiert (Abb. 6.19).

Bei FACS und Durchflusscytometrie werden monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene eingesetzt. Das FACS-Gerät sortiert die Zellen und sammelt sie in getrennten Gefäßen. Bei der Durchflusscytometrie wird die Fluoreszenzmarkierung registriert und das Ergebnis grafisch dargestellt.

Immunologisches Gedächtnis und Impfung

Individuen, die eine Infektion durchmachen, werden in der Regel immun gegen diesen speziellen Erreger, nicht jedoch gegen Erreger anderer Infektionskrankheiten. Der Grund dafür ist, dass sich das Immunsystem an die fremden Antigene „erinnert“, ein Prozess, den man als **immunologisches Gedächtnis** bezeichnet. Begegnet das Individuum dem Antigen ein weiteres Mal, wird die Abwehrreaktion schneller aktiviert und sie ist aggressiver als bei der ersten Infektion. Eindringende Mikroorganismen werden dadurch in der Regel erfolgreich bekämpft, bevor Krankheitssymptome auftreten.

Das immunologische Gedächtnis beruht auf spezialisierten B-Zellen, die man als **Gedächtniszellen** bezeichnet. Wie bereits beschrieben, beginnen naive B-Zellen sich zu teilen, wenn ein Antigen, dem sie begegnen, an die von ihnen präsentierten Antikörper bindet. Die meisten der neuen B-Zellen sind auf die Antikörpersynthese spezialisiert und leben nur ein paar Tage. Einige wenige aktive Zellen werden jedoch zu Gedächtniszellen umgewandelt, und statt Antikörper zu produzieren verharren sie in einem Ruhezustand. Begegnen sie irgendwann dem Antigen, das sie erkennen, ein zweites Mal, gehen die meisten B-Zellen sehr schnell zur Antikörperproduktion über.

Impfungen machen sich das immunologische Gedächtnis zunutze. **Impfstoffe** bestehen aus verschiedenen Derivaten von infektiösen Agenzien, die keine Krankheiten verursachen können, jedoch immer noch als Antigene fungieren können, d.h., sie

induzieren die Immunantwort. So werden z.B. durch Hitze abgetötete Bakterien eingesetzt. Die Antigene auf den toten Bakterien stimulieren immer noch die Teilung der B-Zellen. Einige der B-Zellen werden zu Gedächtniszellen, sodass das Immunsystem bereits vorbereitet ist, wenn die dem Impfstoff entsprechenden, lebenden Keime das geimpfte Individuum zu einem späteren Zeitpunkt angreifen.

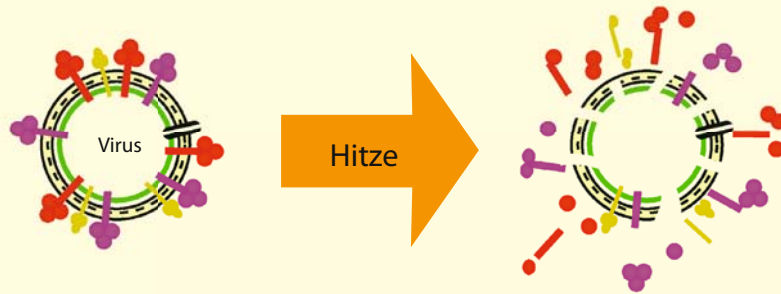
Herstellung eines Impfstoffes

Die Herstellung von Impfstoffen macht einen Großteil der biotechnologischen Industrie aus und hat große Bedeutung für unser Gesundheitssystem. Daher wird viel Geld in die Forschung investiert, um neue und bessere Impfstoffe zu finden. Viele Impfstoffe werden bereits Babys verabreicht; daher sind ihre Sicherheit und Wirksamkeit außerordentlich wichtig. Für die Entwicklung von Impfstoffen gibt es viele unterschiedliche Methoden.

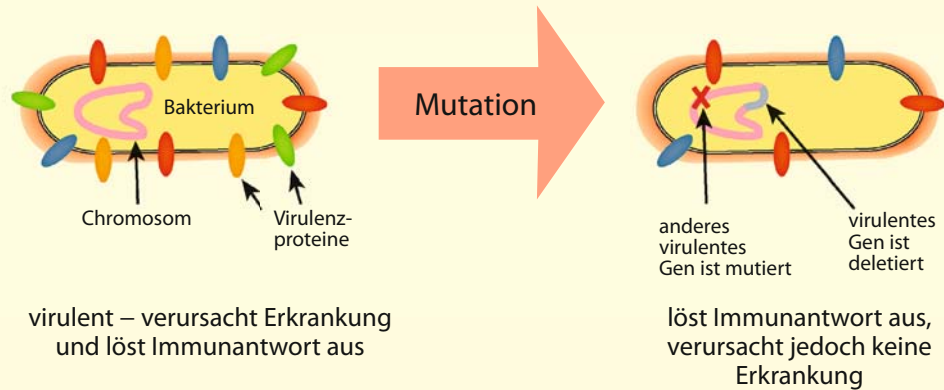
Die meisten Impfstoffe bestehen einfach aus dem infektiösen Agens, das durch Hitze oder über chemische Verfahren denaturiert wurde. Diese Behandlung inaktiviert das Virus oder das Bakterium, sodass es keine Symptome mehr hervorrufen kann. Die ursprüngliche Struktur bleibt jedoch ausreichend gut erhalten, um die Immunantwort auszulösen. Infiziert das lebende Agens anschließend die geimpfte Person, dann werden B-Gedächtniszellen aktiviert, und die Krankheit wird supprimiert. Diese Vollimpfstoffe lösen die stärksten Immunantworten aus, doch viele Krankheitserreger lassen sich nicht isolieren oder kultivieren, um solche Impfstoffe gewinnen zu können. Die Kosten für die Kultivierung des Pathogens sind außerdem unerschwinglich hoch, und die Anzucht von lebenden Viren ist für die damit betrauten Menschen nicht ungefährlich. Diese Aspekte führten zu verschiedenen Strategien für die Entwicklung besserer und leichter handhabbarer Impfstoffe.

Abgeschwächte (attenuierte) Impfstoffe enthalten lebende Krankheitserreger, die das krankheitsverursachende Toxin oder Protein nicht mehr synthetisieren (Abb. 6.20). Manchmal werden Viren oder Bakterien gentechnisch verändert und die Gene entfernt, die zu den Symptomen führen. Bei anderen abgeschwächten Impfstoffen handelt es sich um nichtpathogene Stämme, die mit dem infektiösen Agens verwandt sind (s. Exkurs 6.1). Die Herstellung abgeschwächter Viren birgt auch nicht solche Risiken

a hitzedenaturiertes Virus



b abgeschwächte Bakterien



6.20 Zu den Vollimpfstoffen gehören abgetötete und abgeschwächte Pathogene

a Hitze oder eine chemische Behandlung tötet Pathogene ab, doch die verbleibenden intakten Antigene reichen aus, um eine Immunantwort auszulösen. Nach dem ersten Kontakt mit einem toten Virus oder Bakterium werden B-Gedächtniszellen gebildet. Sie hindern ein lebendes Pathogen daran, die geimpfte Person erfolgreich zu infizieren und krank zu machen.

b Abgeschwächte Viren oder Bakterien wurden mutiert oder gentechnisch verändert, um die Gene zu entfernen, die für das Auslösen der Krankheit verantwortlich sind. Das Immunsystem bildet Antikörper gegen das abgeschwächte Pathogen und auch hier entstehen B-Gedächtniszellen, die in Zukunft eine Infektion verhindern.

Exkurs 6.1

Kuhpocken und Pocken

Eine Infektion mit Kuhpocken ruft nur schwache Krankheitssymptome hervor, verleiht jedoch Immunität gegen die häufig tödlichen Pocken. Im Mittelalter erkrankte ein erheblicher Teil der Bevölkerung an Pocken. Etwa 20 bis 30% der erkrankten Menschen starben, und die Überlebenden waren durch Pockennarben in ihren Gesichtern entstellt. Melkerinnen litten nur selten an dieser Krankheit, da sie bereits an Kuhpocken erkrankten. Diese

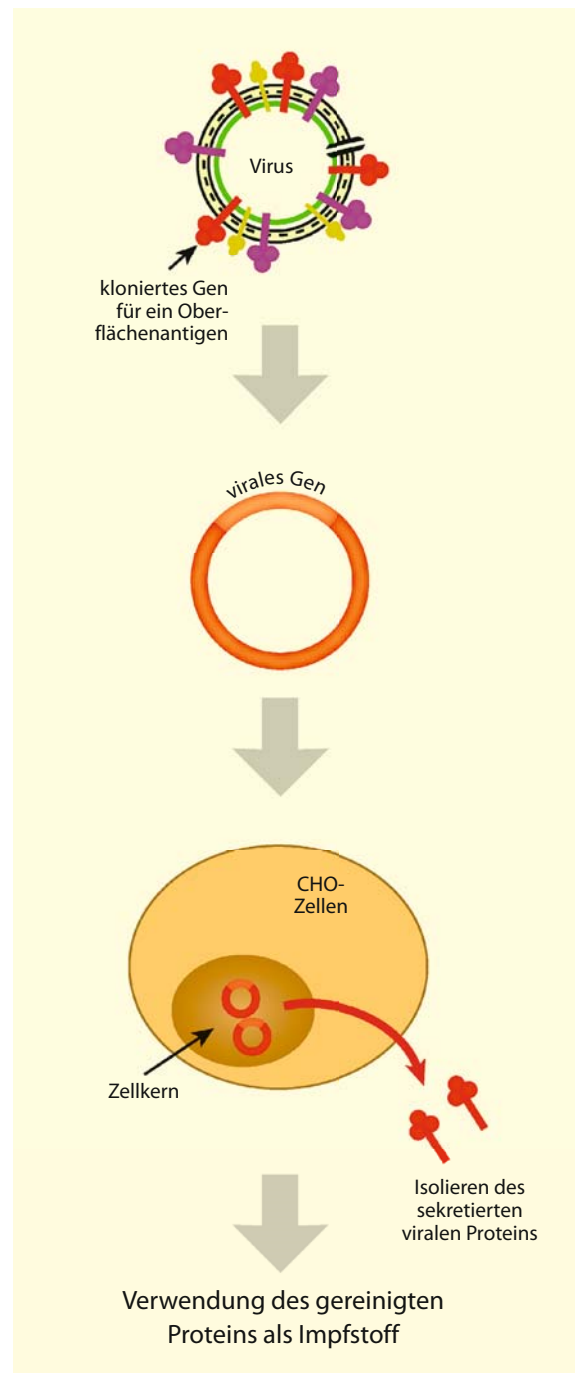
Frauen waren daher nur selten von Narben gezeichnet und waren wegen ihrer Schönheit und reinen Haut sehr angesehen. Diese Tatsache führte schließlich zu Edward Jenners klassischen Experimenten, bei denen er Kinder mit Kuhpocken impfte und zeigte, dass eine solche Behandlung vor einer Infektion mit Pocken schützt. Die Bezeichnung „Vakzinierung“ (Synonym für Impfung) stammt von dem lateinischen Begriff *vacca* für Kuh ab.

wie die Kultivierung der pathogenen Erreger. Doch nur über eine aufwendige Forschung lassen sich die Gene identifizieren, die für die Krankheit tatsächlich verantwortlich sind. Ein weiterer Nachteil eines abgeschwächten Virus kann die Mutation in Richtung der pathogenen Ausgangsform sein, insbesondere, wenn das abgeschwächte Virus in nur einem krankheitsverursachenden Gen mutiert ist.

Spaltimpfstoffe (engl. *subunit vaccines*) sind Impfstoffe, die nur einen Bestandteil des krankheitsverursachenden Agens enthalten und nicht den gesamten Erreger (Abb. 6.21). Spaltimpfstoffe stehen nur aufgrund der Fortschritte in der DNA-Rekombinationstechnologie zur Verfügung. Der erste Schritt bei der Herstellung eines Spaltimpfstoffes ist die Identifizierung eines Proteins oder Proteinbereichs, der eine ausreichend starke Immunantwort auslöst. Proteine aus dem Inneren des Pathogens würden das Immunsystem im Falle einer Infektion nicht aktivieren. Daher werden die meisten Spaltimpfstoffe aus Proteinen hergestellt, die sich auf der Oberfläche eines Virus oder eines Bakteriums befinden. Das jeweilige Protein, das für die Herstellung eines Spaltimpfstoffes ausgewählt wurde, wird analysiert und evaluiert. Sobald ein geeignetes Protein entdeckt ist, wird es in Säugerzellen, Eiern oder einem anderen, leicht handhabbaren System exprimiert. Das Zielprotein wird isoliert, von den anderen Proteinen abgetrennt und anschließend für die Immunisierung von Mäusen verwendet, um seine Leistungsfähigkeit zu testen. Nach ausgiebigen Testreihen an Tieren wird das gereinigte Protein schließlich als Impfstoff eingesetzt.

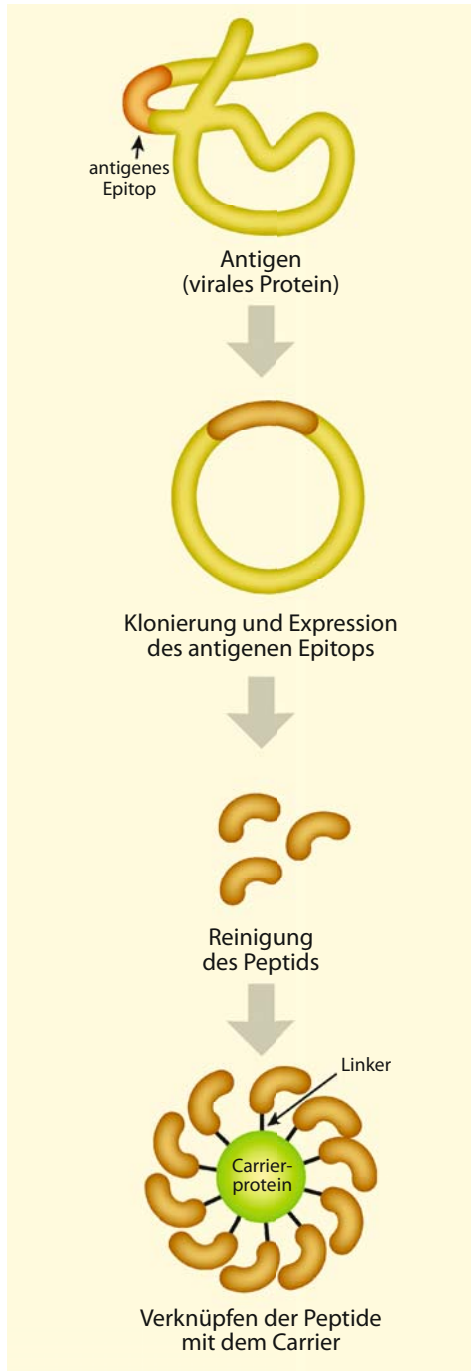
Gelegentlich verfehlen Spaltimpfstoffe ihre Wirkung, möglicherweise weil das Protein nicht korrekt gefaltet wird, wenn es in Säugerzellen oder Eiern exprimiert wird. In diesen Fällen werden **Peptidimpfstoffe** hergestellt. Diese Impfstoffe bestehen nur aus einem kleinen Bereich des Proteins. Da die Peptide sehr klein sind, werden sie mit einem **Carrier** oder **Adjuvans** konjugiert (Abb. 6.22). Diese reichen von nichtpathogenen Viren oder Bakterien bis hin zu anderen Proteinen, die selbst eine stärkere Immunantwort hervorrufen, als das Protein, das eigentlich die Immunantwort auslöst.

Als Impfstoffe werden abgetötete Pathogene, abgeschwächte Pathogene, einzelne Proteine oder Epitope eines krankheitsverursachenden Pathogens verwendet. Diese werden isoliert und dem Menschen injiziert, um die Immunantwort auszulösen ohne Krankheitssymptome zu verursachen.



6.21 Spaltimpfstoffe beruhen auf einem einzelnen Antigen

Aus einem Pathogen wird ein einzelnes antigenes Protein isoliert und das entsprechende Gen in einen Expressionsvektor kloniert. Das Gen wird in Säugerzellkulturen (wie den Ovarzellen des chinesischen Streifenhamsters; CHO-Zellen) exprimiert, das Protein wird isoliert, gereinigt und als Impfstoff eingesetzt.



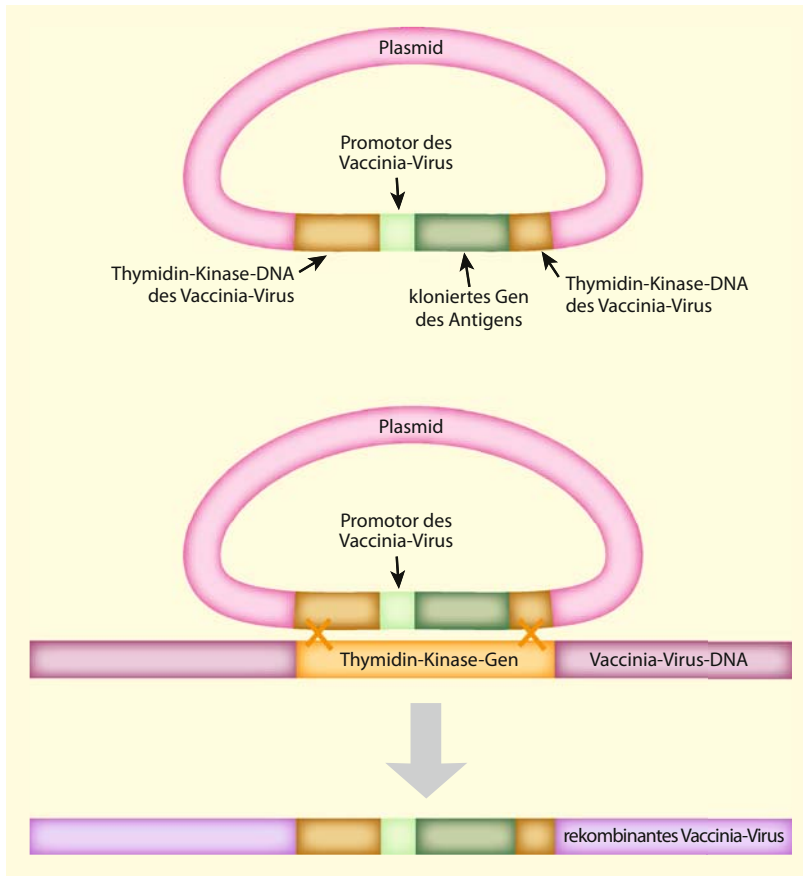
6.22 Peptidimpfstoffe werden mit Carrierproteinen konjugiert

Peptidimpfstoffe sind kleine Abschnitte eines antigenen Proteins aus einem Pathogen. Das Peptid ist häufig ein Epitop, das eine starke Immunantwort auslöst. Da das Peptid sehr klein ist, werden viele Peptide mit einem Carrierprotein konjugiert, um einen Abbau zu verhindern und das Immunsystem zu stimulieren.

Herstellung von Vektorimpfstoffen durch homologe Rekombination

Eine weitere Möglichkeit, ein fremdes Antigen so zu präsentieren, dass es als Impfstoff dienen kann, ist der **Vektorimpfstoff**. Durch den Einsatz gentechnischer Verfahren wird ein krankheitsverursachendes Antigen auf der Oberfläche eines nichtpathogenen Virus oder Bakteriums exprimiert. Infiziert dieses Pathogen eine Person, dann wird eine Immunantwort sowohl gegen den nichtpathogenen Mikroorganismus als auch gegen das daran gekoppelte Antigen induziert. So ist das Vaccinia-Virus ein nichtpathogener Verwandter des Pockenvirus. Der Einsatz des Vaccinia-Virus ist so effizient, dass die Pocken heute als ausgerottet gelten. Würde das Vaccinia-Virus so verändert, dass es ein Antigen eines anderen tödlichen Virus exprimiert, dann wäre die geimpfte Person gegen Pocken und gleichzeitig auch gegen das andere Virus immun. Es lassen sich viele Gene in ein Virus einbauen, die Resistenz gegen verschiedene Infektionskrankheiten verleihen. Der Vorteil des Vaccinia-Virus ist, dass es sehr potent ist und die Entwicklung von B- und T-Zellen stimuliert. Im Gegensatz dazu aktivieren viele andere Impfstoffe, insbesondere die Spaltimpfstoffe, ausschließlich die B-Zell-Reaktion.

Der Einbau von Genen in das Vaccinia-Genom ist kompliziert, weil das Genom nur sehr wenige Restriktionsschnittstellen besitzt. Die Sequenz des Genoms ist jedoch bekannt. Daher ist es möglich, Gene durch **homologe Rekombination** hinzuzufügen (Abb. 6.23). Bei der homologen Rekombination lagern sich zwei Abschnitte ähnlicher oder homologer DNA aneinander, ein Strang jeder DNA-Helix wird gespalten und in einem **Crossing-over** ausgetauscht. Ein einzelnes Crossing-over führt zu einem Hybridmolekül; treten zwei Crossing-over nahe beieinander auf, dann werden große Bereiche der DNA ausgetauscht. Während der homologen Rekombination von Vaccinia, entsteht zunächst in der hinzutretenden neuen DNA durch einen Doppelstrangbruch ein Bereich einzelsträngiger DNA. Der einzelsträngige Abschnitt dringt in die Doppelhelix des Vaccinia-Genoms ein, und es bildet sich eine Dreifachhelix. Einer der Stränge aus Vaccinia liegt nun frei und hybridisiert mit dem homologen einzelsträngigen Abschnitt des hinzutretenden Gens. Findet dieser Vorgang an beiden Seiten statt, wird das fremde Gen in das Vaccinia-Genom eingebaut.



6.23 Das Vaccinia-Genom erhält durch homologe Rekombination neue Gene

Das Plasmid enthält zwei Abschnitte, die zu dem viralen Gen für die Thymidin-Kinase homolog sind und den Bereich des klonierten Gens für das Antigen flankieren. Lagert sich das Plasmid an das Vaccinia-Genom, dann rekombinieren die homologen Bereiche. Das rekombinante Vaccinia-Genom trägt anschließend das klonierte Gen des Antigens, das Gen für die Thymidin-Kinase fehlt.

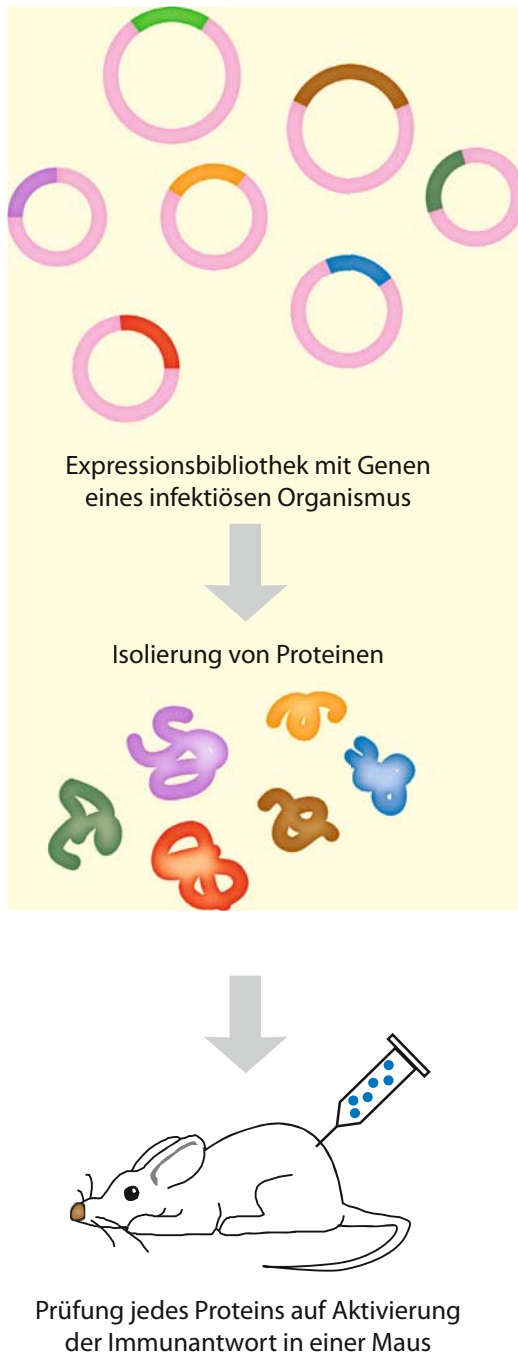
Verändert man ein harmloses Virus oder Bakterium so, dass es ein Protein eines krankheitsverursachenden Pathogens auf seiner Oberfläche exprimiert, wird das Immunsystem bei einer Impfung Antikörper gegen das Pathogen synthetisieren.

Reverse Impfstoffentwicklung

Mittlerweile wurden die Genome von vielen infektiösen Agenzien sequenziert. Die **reverse Impfstoffentwicklung** nutzt die zur Verfügung stehenden Sequenzinformationen, um neue Antigene für die Impfung zu finden (Abb. 6.24). Die Erforschung beginnt mit der Klonierung jedes Gens aus einem in-

fektiösen Organismus und der Herstellung einer Expressionsbibliothek. Alle Proteine werden exprimiert, isoliert, gereinigt und anschließend in Mäusen auf die Auslösung einer Immunantwort hin überprüft. Die Proteine werden hinsichtlich der Stimulierung des Immunsystems und der Fähigkeit, die Mäuse vor einer Infektion durch das tatsächlich infektiöse Agens zu schützen, getestet. Proteine, die die stärkste Reaktion auslösen, sind entweder die Basis für einen Spaltimpfstoff oder werden als eigene Impfstoffe eingesetzt.

Mithilfe der reversen Impfstoffentwicklung entwickelte man einen Impfstoff gegen *Neisseria meningitidis* Serotyp B, den wichtigsten Auslöser für die eitrige Hirnhautentzündung bei Kindern. Abgeschwächte Bakterien waren als Impfstoffe nicht geeignet und bis zur Sequenzierung des *N. meningitidis*-Genoms war kein Impfstoff verfügbar. In *E. coli* wurde eine Bibliothek aus 350 verschiedenen *N. meningitidis*-Proteinen exprimiert und die Proteine



6.24 Reverse Impfstoffentwicklung

Die reverse Impfstoffentwicklung nutzt die Gene, die im Genom des pathogenen Agens identifiziert wurden. Diese Gene werden zunächst in Expressionsvektoren kloniert und exprimiert. Jedes der so synthetisierten Proteine wird in einer Maus auf das Auslösen einer Immunreaktion geprüft.

isoliert. Mithilfe der FACS- und ELISA-Technologie wurden diese Moleküle auf ihre Anwesenheit auf der Oberfläche der Bakterien überprüft. Oberflächenproteine wurden anschließend daraufhin getestet, inwiefern sie das Immunsystem effizient aktivieren. Von den 350 geprüften Proteinen blieben nur 29 als potenzielle Kandidaten übrig und werden zurzeit zu Impfstoffen entwickelt. Ohne die genomische Sequenz des Erregers wäre die Entwicklung von Impfstoffen häufig nicht möglich, doch nun lassen sich neue aufkommende Infektionskrankheiten analysieren und leistungsfähige Impfstoffe entwickeln.

Die reverse Impfstoffentwicklung nutzt exprimierte genomische Sequenzen für die Herstellung neuer Impfstoffe. Konventionelle Impfstoffe werden unter Verwendung der pathogenen Organismen konstruiert. Die Bezeichnung „revers“ bezieht sich auf den Einsatz von exprimierter DNA statt der Verwendung gereinigter Proteine aus dem Organismus.

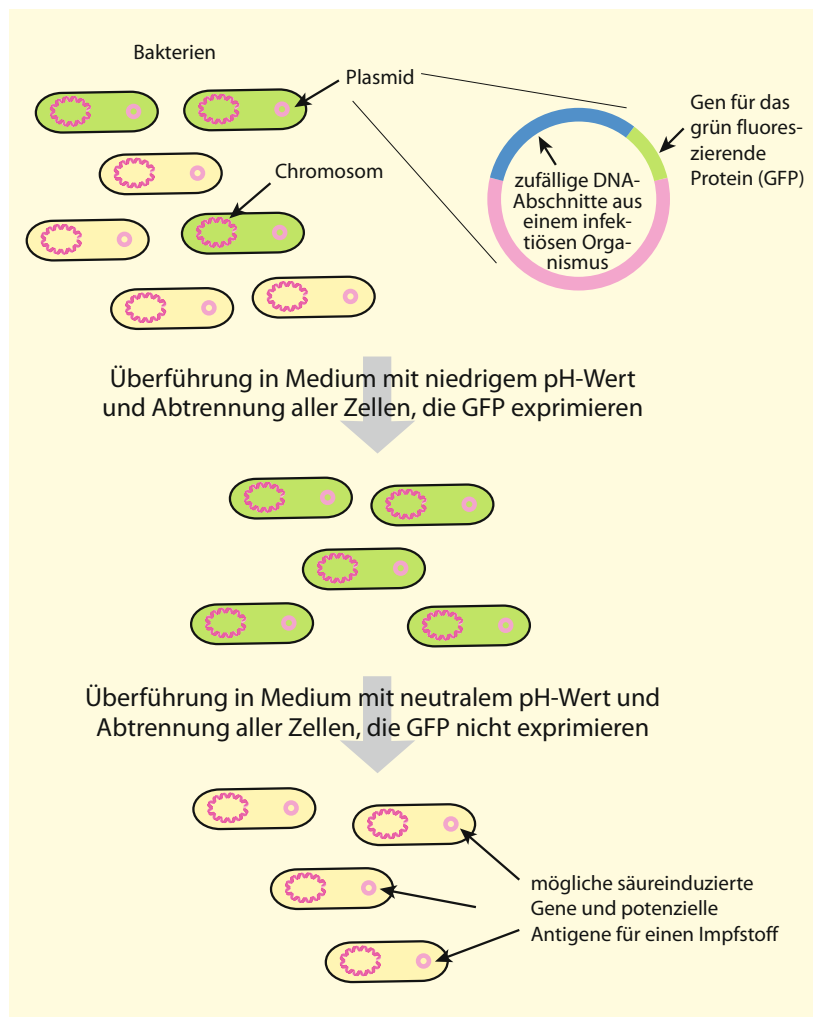
Identifizierung neuer Antigene für Impfstoffe

Ein weiterer Ansatz zur Herstellung neuer Impfstoffe ist die Identifizierung von Genen bakterieller Pathogene, die exprimiert werden, wenn das Pathogen in den Wirt eindringt. Diese Gene codieren in der Regel Proteine, die sich von den Oberflächenantigenen unterscheiden. Ihre Expression führt zu einer Reihe von Anpassungen des Pathogens, die das Überleben im Wirtsorganismus sichern. Bakterien, die in ein Tier eindringen, werden in der Regel durch Phagocyten aufgenommen und von Enzymen des Lysosoms verdaut. Einige Pathogene werden wie gewöhnlich aufgenommen, doch sie entgehen einem Verdau. Zu den Modifikationen, die für ein intrazelluläres Leben notwendig sind, gehören z.B. die Veränderung der Nährstoffe und des Stoffwechsels und die Etablierung von Mechanismen, die gegen Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus schützen. Viele verschiedene Gentypen sind für diese Umstellung erforderlich, und die Produkte dieser Gene sind potenzielle Antigene für die Entwicklung von Impfstoffen.

Die Identifizierung von Genen, die nur im Wirtsorganismus exprimiert werden, beruht in der Regel

auf Genfusionen. Die mutmaßlichen Genkandidaten werden mit einem Reportergen fusioniert, wie dem Gen für die β -Galactosidase, die Luciferase oder das grün fluoreszierende Protein (GFP). Sie können auch an Epitop-Tags gekoppelt werden, wie FLAG oder myc (s. Kap. 9). Das fusionierte Gen wird in den pathogenen Organismus eingeschleust, der anschließend den Wirt infiziert. Die Expressionsstärke des Reportergens korreliert mit der des Zielgens. Wird das Zielgen z.B. mit dem Gen für GFP fusioniert, lässt sich die Stärke der Fluoreszenz mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie oder fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie messen. Nimmt die Stärke der Fluoreszenz mit dem Ausmaß der Invasion in die Wirtszelle zu, dann ist das Zielgen ein potenzieller Impfstoffkandidat, weil es für die bakterielle Pathogenese möglicherweise wichtig ist.

Einzelne Genfusionen sind für die Untersuchung von Kandidatengen sinnvoll, doch für die Suche nach neuen Genen ist diese Methode nicht geeignet. Stattdessen bedient man sich der **differenziellen Fluoreszenzinduktion (DFI)**, die eine Kombination aus GFP-Fusion und FACS (s. oben) darstellt, um Gene zu identifizieren, die mit der Invasion in die Wirtszelle assoziiert sind (Abb. 6.25). Zunächst wird eine Bibliothek von Genen aus dem pathogenen Organismus mit GFP fusioniert. Die Bibliothek wird in Bakterienzellen transformiert, in denen die fusionierten Gene exprimiert werden. Die Bakterien werden anschließend einem Reiz ausgesetzt, der dem einer Invasion in die Wirtszelle ähnelt. So ändert sich z.B. der pH-Wert der Umgebung, wenn die Phagocyten die Bakterien aufnehmen, von neutral (pH 7) nach sauer (pH 4). Um zu ermitteln, ob



6.25 Differenzielle Fluoreszenzinduktion (DFI)

Zunächst werden die Gene des interessierenden Pathogens im Leseraster mit dem GFP-Gen kloniert. Die Fusionsproteine werden anschließend in Bakterien exprimiert. Nun säuert man das Medium, in dem sich die Bakterienpopulation befindet, an. Die Bakterien, die GFP exprimieren, werden isoliert. Diese Klone exprimieren GFP entweder konstitutiv, oder die Expression wurde durch den geringen pH-Wert induziert. Um die Klone zu isolieren, die nur bei geringem pH-Wert eine Expression zeigen, werden die grünen Zellen wieder in neutrales Medium überführt. Dieses Mal werden nur die Zellen gesammelt, in denen die GFP-Expression nachlässt. Dieses Verfahren wird wiederholt, sodass am Ende ausschließlich solche Zellen übrig bleiben, deren Gene nur bei niedrigem pH-Wert exprimiert werden.

die Veränderung des pH-Wertes einen Einfluss auf die Genexpression hat, wird das Medium, in dem sich die Bakterien der Fusionsbibliothek befinden, angesäuert. Anschließend werden sie mithilfe von FACS sortiert und die Zellen gesammelt, die eine hohe GFP-Expression zeigen. Wird das mit GFP fusionierte Gen tatsächlich durch einen geringen pH-Wert induziert, dann sollte die GFP-Konzentration in der Zelle fallen, wenn diese wieder in ein neutrales Medium überführt wird. Daher wird der pH-Wert wieder auf pH 7 eingestellt und die Zellen nochmals sortiert, doch dieses Mal werden die Bakterien gesammelt, die eine geringe Fluoreszenz zeigen. Der nun kleinere Pool an Bakterien wird nochmals durch einen niedrigen pH-Wert stimuliert, sortiert, und wieder werden die Zellen mit hoher GFP-Expression gesammelt. Durch dieses Verfahren lassen sich konstitutiv exprimierte Gene und auch Gene aussortieren, die durch einen geringen pH-Wert nicht induziert werden. Die übrigen Gene sind säureinduzierte Gene, durch deren Expression sich der Organismus an das Leben innerhalb des Wirtes anpasst. Die Produkte dieser Gene lassen sich nun auf ihre Eignung als Antigene für die Impfstoffentwicklung testen.

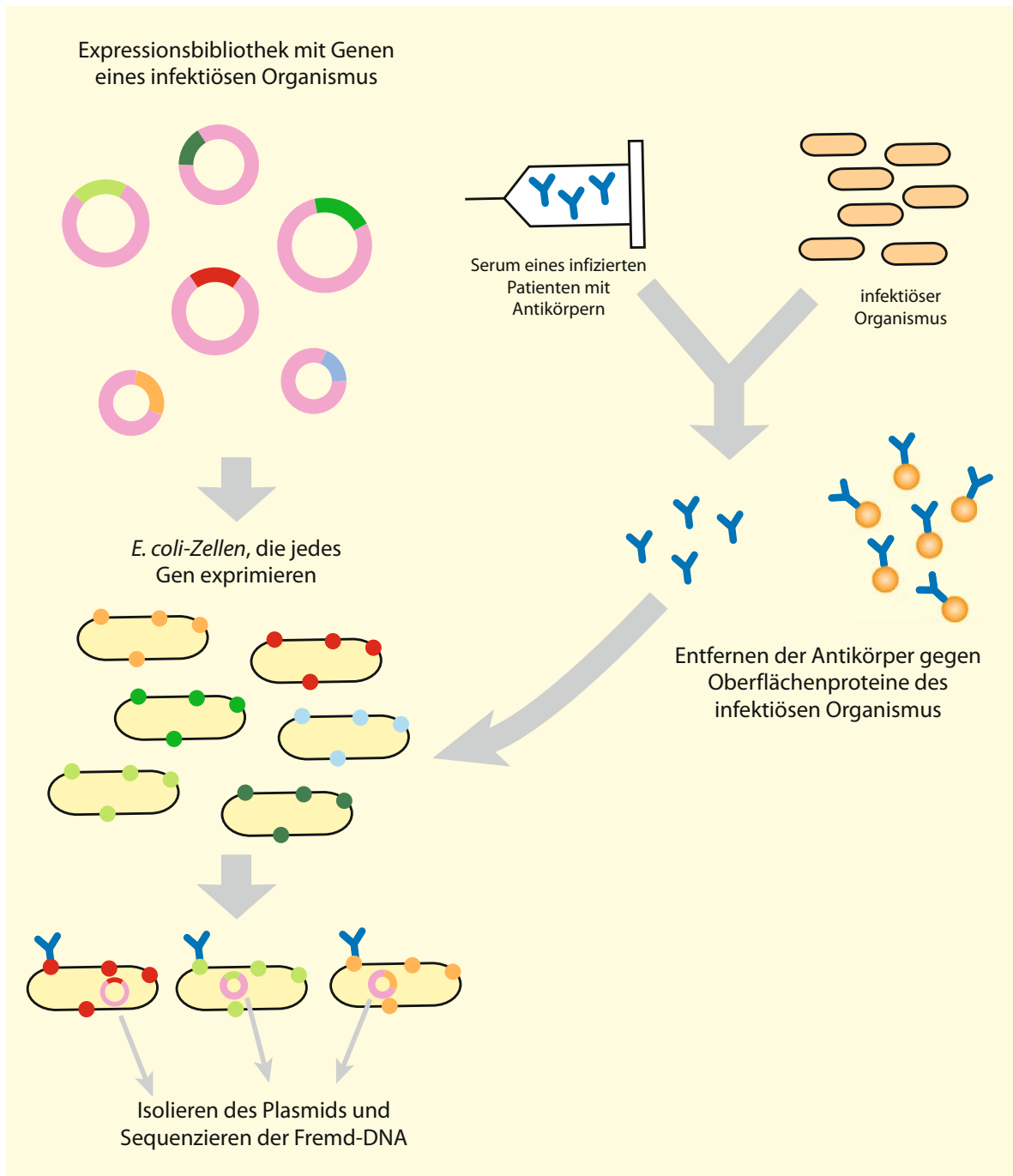
Ein weiteres Verfahren zur Identifizierung neuer Antigene für die Impfstoffentwicklung ist die **in vivo-induzierte Antigentechnologie (IVIAT)** (Abb. 6.26). Dieses Verfahren nutzt das Serum von Patienten, die von dem Erreger infiziert wurden, gegen den der Impfstoff entwickelt werden soll. Das Serum ist reich an Antikörpern gegen das entsprechende infektiöse Agens. Es wird mit einer Probe des krankheitsverursachenden Mikroorganismus gemischt. Dadurch werden Antikörper entfernt, die an Proteine binden, welche von dem Mikroorganismus exprimiert werden, während er sich außerhalb des Wirtes befindet. Im Pool bleiben Antikörper gegen Proteine, die nur während der Infektion gebildet werden. Um die Proteine zu identifizieren, an die diese Antikörper binden, stellt man eine genomische Expressionsbibliothek her, die alle Gene des Mikroorganismus enthält. Die Bibliothek wird in *E. coli* exprimiert und mit den verbleibenden Antikörpern im Pool getestet. Passt ein Antikörper auf einen Klon der Bibliothek, wird das entsprechende Fremdgen sequenziert, um das Antigen zu identifizieren. Dieses Verfahren erkennt die Proteinantigene, die die Antikörperproduktion während einer echten Infektion stimulieren, direkt; daher sind die auf diese Weise identifizierten Antigene mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Kandidaten für die Impfstoffentwicklung.

Pathogene müssen ihren Stoffwechsel verändern, wenn sie sich von einem freilebenden Organismus zu einem Organismus entwickeln, der in einem Wirt lebt. Die Proteine, die das Pathogen bei dieser Anpassung unterstützen, sind Kandidaten für die Impfstoffherstellung.

DFI und IVIAT sind zwei Methoden, mit deren Hilfe sich Proteine identifizieren lassen, die für ein Leben innerhalb eines Organismus notwendig sind. Bei DFI werden Impfstoffkandidaten mit Fluoreszenzmarkern fusioniert und die Klone selektiert, die ausschließlich bei einem Leben innerhalb des Organismus exprimiert werden. Bei IVIAT wird dagegen das Serum von infizierten Patienten eingesetzt, um Antikörper zu finden, die an intrazelluläre pathogene Proteine binden.

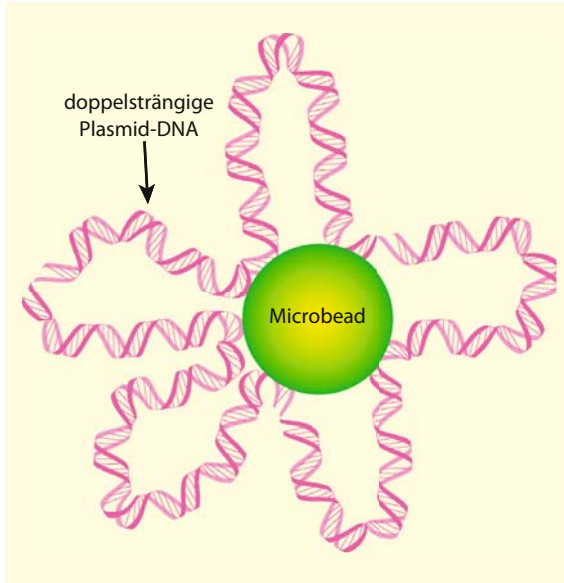
DNA-Impfstoffe machen eine Aufreinigung von Antigenen überflüssig

Die Verwendung eines **DNA-Impfstoffes** beruht darauf, dass die DNA, die ein bestimmtes Antigen codiert, verabreicht wird, statt des gesamten Mikroorganismus oder der gereinigten Proteine. Nackte DNA-Impfstoffe bestehen aus Plasmiden, die das antigencodierende Gen enthalten, dessen Expression von einem starken Promotor kontrolliert wird; häufig wird hier der *intermediate early*-Promotor aus dem Cytomegalievirus eingesetzt. Die DNA wird direkt in das Muskelgewebe injiziert. Die Fremdgene werden über ein paar Wochen exprimiert und das codierte Protein in Mengen synthetisiert, die ausreichen, um eine Immunantwort auszulösen. Die Immunantwort ist auf den jeweiligen Muskel beschränkt, wodurch Nebenwirkungen vermieden werden. Außerdem ist gereinigte DNA in der Herstellung viel kostengünstiger als gereinigtes Protein und lässt sich getrocknet bei Raumtemperatur lagern. Die am besten geeignete Methode zur Verabreichung der DNA ist, sie an Mikropartikel mit einer kationischen Oberfläche zu heften (Abb. 6.27), an die das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat gut bindet. Nachdem das Mikropartikel mit der anhaftenden DNA in die Zelle geschleust wurde, beginnt sich die DNA langsam von dem Partikel zu lösen und wird exprimiert. Das langsame Ablösen der DNA führt zu einer effizienteren Immunant-



6.26 In vivo-induzierte Antigentechnologie (IVIAT)

Die Suche nach Antigenen für die Herstellung von neuen Impfstoffen beruht auf der Identifizierung von Proteinen, die eine Immunantwort auslösen. Mithilfe von IVIAT lassen sich Antikörper erkennen, die im Serum von Patienten enthalten sind, welche einem Pathogen ausgesetzt waren. Zunächst wird eine Expressionsbibliothek hergestellt, die jedes Gen des interessierenden Pathogens enthält. Als nächstes wird Serum von infizierten Patienten gesammelt und mit dem kultivierten infektiösen Organismus inkubiert, um die Antikörper abzufangen, die Oberflächenantigene erkennen. Die verbleibenden Antikörper werden anschließend für ein Screening der Expressionsbibliothek eingesetzt. Erkennt ein Antikörper ein kloniertes Protein, wird der entsprechende DNA-Klon sequenziert, um das Genprodukt zu identifizieren.



6.27 DNA-beschichtete Microbeads

Microbeads werden mit Plasmid-DNA, die ein Gen für ein Antigen enthält, beschichtet und einem Patienten injiziert. In den Zellen löst sich die Plasmid-DNA langsam ab und das Gen wird so über einen längeren Zeitraum exprimiert. Das exprimierte Protein löst eine Immunantwort aus, ohne Krankheitssymptome hervorzurufen, und impft auf diese Weise die Person gegen zukünftige Angriffe des Pathogens.

wort als ein einmaliges Freisetzen einer großen DNA-Menge. Das Immunsystem muss dadurch immer mehr Antikörper gegen die synthetisierten Proteine herstellen.

DNA-Impfstoffe sind allerdings insofern problematisch, als manche DNA-Sequenzen selbst eine Immunantwort induzieren können. Insbesondere lösen einige DNA-Sequenzmotive aus bakterieller DNA starke Reaktionen des Immunsystems aus. Diese können wiederum dazu führen, dass der Körper seine eigene DNA angreift und so eine Autoimmunreaktion ausgelöst wird.

Statt aus Protein bestehen einige Impfstoffe lediglich aus DNA eines Gens, dessen Produkt eine Immunantwort auslöst. Nachdem die DNA in die Zelle geschleust wurde, wird sie exprimiert, das Protein wird synthetisiert und löst die Immunantwort aus, wodurch die betreffende Person immunisiert wird.

Orale Impfstoffe

Viele Impfstoffe sind hitzeempfindlich und bauen sich ab, wenn sie nicht gekühlt werden. Dies stellt insbesondere in Entwicklungsländern ein Problem dar, wo eine korrekte Lagerung oft nicht möglich ist. Außerdem sind qualifiziertes Personal und saubere Nadeln notwendig, um Impfinjektionen durchzuführen. Eine Alternative zu einer Injektion sind die **oralen Impfstoffe**. Diese werden als Tabletten, Kapseln oder in flüssiger Form als sogenannte Schluckimpfung verabreicht. Voraussetzung für die Wirksamkeit ist, dass die Antigene nicht durch Enzyme des Verdauungstraktes abgebaut werden. Ein Beispiel für einen solchen Impfstoff ist der orale Impfstoff gegen Polio, der lebende aber abgeschwächte Polioviren enthält. Der injizierte Polioimpfstoff enthält dagegen inaktivierte Viren. Der Vorteil der Schluckimpfung ist, dass die abgeschwächten Viren den Darm besiedeln und das Immunsystem auf die gleiche Art und Weise stimulieren, wie die virulente Form des Virus. Ein Nachteil ist jedoch, dass die abgeschwächten aber lebenden Viren bei einer von 2,5 Millionen Impfungen zur virulenten Form konvertieren könnten und die geimpfte Person dann an Polio erkrankt. In Ländern, in denen Polio nur selten vorkommt, ist dieses Risiko zu hoch. Die früher in Deutschland durchgeführte Schluckimpfung wurde deshalb durch eine Injektion mit abgetöteten Viren ersetzt.

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung eines hitzestabilen, günstigen Impfstoffes ist, die Antigene in Pflanzen zu exprimieren und die Pflanzen zu verzehren. Der Vorteil dieser **essbaren Impfstoffe** ist ihre günstige Herstellung in großen Mengen. Der Patient muss eine bestimmte Menge des Pflanzengewebes zu sich nehmen, um immun zu werden. Die Verteilung des Impfstoffes in Entwicklungsländern ist einfach, und die Speicherung ist die gleiche wie bei Kulturpflanzen. Unterstützt wurde die Entwicklung von essbaren Impfstoffen durch jüngste Fortschritte in der Expression fremder Proteine in Pflanzen (s. Kap. 14). Gentechnisch veränderte Kartoffeln, die den Impfstoff gegen Hepatitis B enthalten, befinden sich zurzeit in klinischen Studien. Freiwillige haben fein geraspelte Stücke roher Kartoffeln zu sich genommen, die ein Oberflächenprotein des Virus enthielten. Bei 60 % der Probanden ließ sich anschließend ein erhöhter Titer von Hepatitis-B-Antikörpern feststellen. Alle Teilnehmer erhielten zuvor den herkömmlichen Impfstoff, sodass der Impfstoff aus der Kartoffel die Immunität lediglich verstärkte.

Der größte Nachteil beim Einsatz von solchen gentechnisch veränderten Pflanzen ist ihre mögliche Vermischung mit normalen Pflanzen und die anschließende Verbreitung dieser Impfstoffpflanzen als normale Nahrungsmittel.

Neben der Entwicklung von Impfstoffen in Nahrungsmitteln, arbeiten die Forscher zurzeit auch an **hitzestabilen oralen Impfstoffen**. Statt Kulturpflanzen wie Mais und Kartoffel werden andere essbare Pflanzen entwickelt, die den Impfstoff exprimieren.

Exkurs 6.2

Schutzimpfung

In Deutschland erhalten die meisten Kinder Impfungen gegen viele verschiedene Krankheiten. Diphtherie, Tetanus, Keuchhusten, Masern, Mumps, Röteln, Windpocken, Polio und Hepatitis B gehören zu den von der ständigen Impfkommmission empfohlenen Impfungen für Kleinkinder. Eine Impfpflicht besteht jedoch nicht. Diese Liste ist lang, aber viele der Impfungen werden in Kombinationsimpfungen zusammengefasst. Paradoxerweise hat die hohe Schutzwirkung von Impfungen dazu geführt, dass viele heute infrage gestellt werden. Man argumentiert, dass Impfungen überflüssig seien, da diese Krankheiten kaum noch auftreten. Leicht wird dabei vergessen, dass nur deshalb so wenige Menschen an Diphtherie oder Masern erkranken, weil die Mehrheit dagegen geimpft ist. 1980 gab es rund 4 Millionen Fälle von Masern, wobei zu diesem Zeitpunkt nur 10 % der Weltbevölkerung einen Impfschutz gegen diese Krankheit besaßen. 2002 wurden weltweit rund 500 000 Fälle der Masern gezählt, während 70 % der Menschen gegen Masern geimpft waren. In Deutschland gibt es aufgrund der Impfskepsis im europaweiten Vergleich relativ viele Neuerkrankungen an Masern. So sind sich Infektionsexperten darin einig, dass das Ziel der Weltgesundheitsorganisation WHO, die Masern bis 2010 aus Europa zu verbannen aufgrund zu niedriger Durchimpfungsraten in einigen Ländern wohl nicht erreicht wird. Während bei den Masern dieses Ziel noch nicht erreicht ist, konnten andere Krankheiten aus der Liste der Standardimpfungen gelöscht werden, da die Krankheiten faktisch ausgerottet sind. So sind weltweit so viele Menschen gegen die Pocken geimpft, dass jahrelang kein einziger Fall mehr aufgetreten ist. Heute wird daher die normale Bevölkerung nicht mehr gegen die Pocken geimpft. Die einzigen Pockenerreger die noch existieren, werden in zwei Laboren aufbewahrt. Eines befindet sich in den USA, das andere in Russland. Nach den Anschlägen auf das World Trade Center im Jahr 2001 konzentrierte man sich sehr auf die Möglichkeit eines bioterroristischen Anschlags mit Pockenviren (siehe Kapitel 23). Manche Menschen plädieren daher für die Wiederaufnahme der Pockenimpfung, um ein erneutes Ausbrechen zu verhindern.

Andere Impfungen zeigen eine entgegengesetzte Problematik. Trotz großflächiger Impfung nimmt die Zahl der Keuchhustenfälle weiter zu. In den USA beispielsweise traten allein 2004 im Staat Wisconsin über 5000 Keuchhustenfälle auf, und auch andere Staaten verzeichneten einen Anstieg der Erkrankungen. 2002 registrierten die

Center for Disease Control in den Vereinigten Staaten mit 9771 Fällen die höchste Zahl an Keuchhustenerkrankungen seit 1964 – die Hälfte davon allein in Wisconsin. Zur Erklärung dieses Anstiegs werden unterschiedliche Theorien herangezogen. Während manche die Zunahme der Keuchhustenfälle auf empfindlichere Nachweismethoden zurückführen, gibt es auch Stimmen, die den Anstieg der Erkrankungen als Teil des natürlichen Zyklus der Pathogenität des Erregers *Bordetella pertussis* erklären. Andere sehen in ihm ein Nachlassen der Immunität gegen die Keuchhustenbakterien. Nach dem Erhalt der letzten Wiederholungsimpfung im Alter von fünf Jahren, lässt die Immunität gegen Keuchhusten nach etwa 10 Jahren nach. In den USA ist eine Erwachsenenimpfung gegen Keuchhusten nicht vorgesehen, weshalb die Menschen relativ ungeschützt gegen die Krankheit sind.

Impfungen können eine Reihe unangenehmer Nebenwirkungen nach sich ziehen. Dies sind in den meisten Fällen lokale Reaktionen an der Einstichstelle wie Schmerzen und Schwellungen. Andere Nebenwirkungen wie leichtes Fieber oder eine milde Form der Erkrankung, wie sie zum Beispiel bei Gripeschutzimpfungen auftreten, sind dagegen systemischer Natur. Manche Impfungen können auch allergische Reaktionen verursachen. Da manche Impfstoffe aus Hühnereiern gewonnen werden, kann es dazu kommen, dass Spuren von Ei-Proteinen als Verunreinigungen im Impfstoff verbleiben. Selbst Menschen mit einer Allergie gegen Ei-Proteine vertragen diese Impfstoffe meist gut, während andere auf sie allergisch reagieren. Eine weitere, potenziell allergieauslösende Substanz in Impfstoffen ist Gelatine.

Andere im Kontext der Impfstoffe geäußerte Sicherheitsbedenken betreffen Konservierungsstoffe. Bis 1999 war das quecksilberhaltige Thiomersal das gebräuchlichste Mittel der Wahl. Es kann bei Kindern ebenfalls allergische Reaktionen auslösen und steht außerdem im Verdacht Autismus hervorrufen zu können. Seit 1999 haben daher viele Hersteller Thiomersal gänzlich aus ihren Impfstoffen verbannt, ohne dass sich diese Maßnahme auf die Häufigkeit von Autismus ausgewirkt hätte. Da sich jedoch die Gerüchte halten, dass Impfungen für Fälle von Autismus verantwortlich sind, greifen viele Hersteller heute zu anderen Konservierungsstoffen. Es ist jedoch vorstellbar, dass ein bestimmter genetischer Hintergrund manche Kinder anfälliger gegenüber Einflüssen von Quecksilber macht als andere.

Dabei handelt es sich z.B. um *Nicotiana benthamiana*, eine essbare Verwandte des Tabaks, die nicht als Nahrungsmittel verwendet wird. Die Pflanze lässt sich leicht transformieren und die Impfstoffantigene werden im Blattgewebe exprimiert. Um das Vorkommen der Antigene auf das Blatt zu begrenzen, werden die rekombinanten Proteine nur in den Chloroplasten produziert. Da Chloroplasten ausschließlich von der Mutter vererbt werden, enthält der Pollen der transgenen Pflanzen kein Transgen. (Würde der Pollen rekombinante Gene enthalten, könnten diese leicht auf normale Tabakkulturen übertragen werden.) Nach der Anzucht der impfstoffexprimierenden Pflanzen werden die Blätter geerntet, gewaschen, gemörsert und gefriergetrocknet. Das Puder wird anschließend in Gelatine kapseln gefüllt. In dieser Form ist der Impfstoff leicht zu transportieren und zu verteilen, die gefriergetrockneten Blätter sind hitzestabil und die Kapseln leicht zu verabreichen. Die Wirksamkeit und die möglichen Nebenwirkungen müssen allerdings noch in klinischen Studien geprüft werden.

Essbare Impfstoffe sind entweder lebende aber abgeschwächte Viren wie bei der Schluckimpfung gegen Polio oder ein antigenes Protein, das in einem Nahrungsmittel exprimiert wird.

► Weiterführende Literatur

- Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA (2003) Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281: 65–78
- Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Clark M (2000) Antibody humanization: A case of the “Emperor’s new clothes”? *Immunol Today* 8: 397–402
- Elgert KD (1996) *Immunology: Understanding the Immune System*. Wiley-Liss, New York
- Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2003) Beyond Herceptin and Gleevec. *Curr Opin Chem Biol* 7: 490–495
- Handfield M, Brady LJ, Progulske-Fox A, Hillman JD (2000) IVIAT: A novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. *Trends Microbiol* 8: 336–339
- Patti JM (2004) A humanized monoclonal antibody targeting *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 22: S39–S43
- Scarselli M, Giuliana MM, Adu-Bobie J, Pizza M, Rappuoli R (2005) The impact of genomics on vaccine design. *Trends Biotechnol* 23: 84–91
- Schütt C, Bröker B (2009) *Grundwissen Immunologie*, 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Valdivia RH, Falkow S (1997) Probing bacterial gene expression within host cells. *Trends Microbiol* 5: 360–363

Nanobiotechnologie

Einführung

Sichtbarmachung im Nanomaßstab

Rastertunnelmikroskopie

Rasterkraftmikroskopie

Nachweis von Viren mittels Rasterkraftmikroskopie

Das Wiegen einzelner Bakterien und Viruspartikel

Nanopartikel und ihre Anwendung

Nanopartikel für die Markierung

Größenquantisierungseffekt und Farben von Nanokristallen

Nanopartikel für die Verabreichung von Arzneistoffen, DNA oder RNA

Nanopartikel in der Krebstherapie

Zusammenbau von Nanokristallen durch Mikroorganismen

Nanoröhrchen

Antibakterielle Nanoschichten

Nachweis von Viren durch Nanokabel

Ionenkanäle als Nanosensoren

Gentechnische Veränderung von DNA im Nanomaßstab

Mechanische DNA-Nanomaschinen

Kontrollierte Denaturierung von DNA durch Nanopartikel aus Gold

Kontrollierte Veränderung der Proteinstruktur durch DNA

Biomolekulare Motoren

Weiterführende Literatur

Einführung

Richard Feynman prognostizierte im Jahr 1959 als erster Wissenschaftler die Zukunft der Nanotechnologie und äußerte die Vermutung, dass Maschinen und Materialien eines Tages auf atomarer Ebene konstruiert würden: „Die physikalischen Gesetze sprechen, soweit ich das beurteilen kann, nicht dagegen, Dinge Atom für Atom bewegen zu können.“

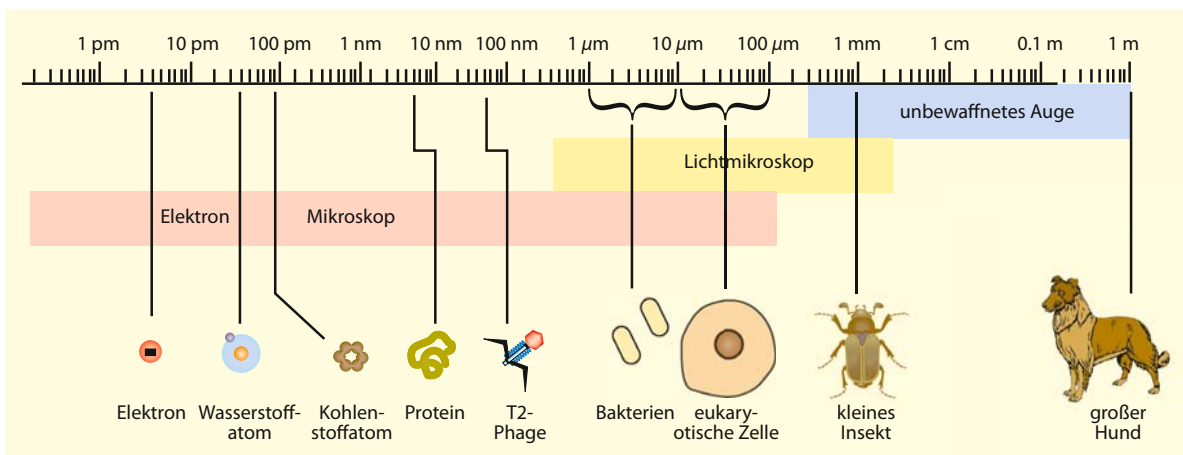
Die Molekularbiologie beschäftigt sich weitgehend mit der Untersuchung von Mikroorganismen. Ein Mikrometer ist ein Millionstel eines Meters und in etwa die Länge einer Zelle von *Escherichia coli*, dem für den Genetiker wichtigsten Bakterium. Ein Nanometer ist ein Tausendstel eines Mikrometers ($= 10^{-9}$ Meter; Abb. 7.1). Die Bezeichnungen *mikro-* und *nano-* stammen beide aus dem Griechischen. „*mikros*“ bedeutet „klein“, „*nanos*“ ist dagegen bildhafter und bedeutet „kleiner alter Mann“ oder „Zwerg“. „*pico-*“ stammt aus dem Spanischen, wo es eine kleine Menge bezeichnet. Vorsilben für noch geringere Mengen sind in Tabelle 7.1 aufgeführt. Mit diesen Begriffen lassen sich subatomare Dimensionen beschreiben. Handelt es sich jedoch um Massen und Volumina im Nanomaßstab, dann werden Begriffe wie Femtogramm und Zeptoliter verwendet.

Vor nicht allzu langer Zeit hat die Wissenschaft den Schritt in den Bereich der **Nanotechnologie** vollzogen. Wie der Name bereits andeutet, ist das Vordringen in diese Thematik eng verknüpft mit der Suche nach neuen praktischen Anwendungen, insbesondere in der Elektronik und der Materialforschung,

und weniger mit der Suche nach theoretischem Wissen. Zur Nanotechnologie gehört die individuelle Manipulation einzelner Moleküle oder Atome. Das ursprüngliche Ziel war möglicherweise, Materialien mit neuen oder stark verbesserten Eigenschaften zu finden, indem man sie Atom für Atom oder Molekül für Molekül aufbaut. Doch das Spektrum erweiterte sich und die Nanotechnologie beschäftigt sich mittlerweile mit Strukturen, die so klein sind, dass ihre Untersuchung und ihre Manipulation bis vor kurzem nicht möglich waren. Im Nanomaßstab nehmen Quanteneffekte zu und die Materialien verhalten sich häufig ungewöhnlich, verglichen mit ihren Festkörpereigenschaften.

Die Bestandteile von biologischen Zellen entsprechen in ihrer Größe in etwa den Materialien, die von der Nanotechnologie untersucht werden. Nanotechnologen suchen daher auch im Bereich der Zellbiologie nach nützlichen Strukturen, Prozessen und Informationen. Zelluläre Organellen wie Ribosomen lassen sich als programmierbare „Nanomaschinen“ betrachten. Die Nanotechnologie drängt somit auch in Richtung Molekularbiologie. Ein Großteil der „Nanobiotechnologie“ ist aus der Sicht der Materialforschung tatsächlich Molekularbiologie, und sie verwendet eine neue Terminologie.

Alle chemischen Reaktionen finden auf Molekülebene statt. Was die echte Nanotechnologie allerdings davon abgrenzt, ist, dass hier einzelne Moleküle oder Nanostrukturen nach spezifischen Anleitungen zusammengesetzt werden. Ein Ribosom polymerisiert nicht einfach Aminosäuren zu einer Kette. Es verwendet entsprechend der zur



7.1 Größenvergleich

Die Größe der Objekte reicht von einem Meter bis zu einem Picometer.

Tabelle 7.1 Vorsilben und Größen

Längeneinheit	Meter	Beispiele
5,9 Terameter		mittlerer Abstand zwischen Sonne und Pluto
Terameter	10^{12}	
150 Gigameter		Abstand der Erde zur Sonne
Gigameter	10^9	
380 Megameter		Abstand des Mondes zur Erde
6,3 Megameter		Radius der Erde
3,2 Megameter		Länge der chinesischen Mauer
Megameter	10^6	
Kilometer	10^3	
30 Meter		Länge eines Blauwals
Meter	1	Länge eines großen Hundes
Millimeter	10^{-3}	kleines Insekt
Mikrometer	10^{-6}	Bakterienzelle
500 Nanometer		Wellenlänge sichtbaren Lichtes
100 Nanometer		Größe eines typischen Virus
3,4 Nanometer		eine Windung der DNA-Doppelhelix
Nanometer	10^{-9}	Moleküle
350 Picometer		Durchmesser eines Wassermoleküls
260 Picometer		Atomabstand in festem Kupfer
77 Picometer		Atomradius von Kohlenstoff (= Auflösungsgrenze eines Rasterkraftmikroskops aus dem Jahr 2004)
32 Picometer		Atomradius von Wasserstoff
Ångström		= 100 Picometer = 10^{-10} Meter
2,4 Picometer		Wellenlänge eines Elektrons
Picometer	10^{-12}	
Femtometer	10^{-15}	Radius eines Atomkerns
Attometer	10^{-18}	Radius eines Protons
Zeptometer	10^{-21}	
Yoctometer	10^{-24}	Radius eines Neutrinos

Verfügung stehenden Information spezielle Aminosäuren und verbindet sie in einer bestimmten Reihenfolge. Zu den entscheidenden Eigenschaften einer Nanomaschine gehört daher die Fähigkeit, Strukturen nicht nur auf Molekülebene zusammenzusetzen, sondern dabei auch spezifisch und kontrolliert vorzugehen.

Das wichtigste praktische Ziel für die Nanobiotechnologie ist die Verwendung von biologischen Komponenten für Anwendungen im Nanomaßstab. Einige dieser Anwendungen sind nichtbiologischer Natur und stammen aus der Elektronik und der EDV, andere sind jedoch für die Biologie oder die Medizin von Bedeutung. In diesem Kapitel soll durch ausgewählte Beispiele gezeigt werden, wie biologische Ansätze einen Beitrag zur Nanobiotechnologie leisten.

Viele Bestandteile biologischer Zellen liegen bezüglich ihrer Größe im Nanobereich. Mit dem Fortschritt der Nanotechnologie ergeben sich viele Verbindungen zur Biotechnologie und zur Gentechnik.

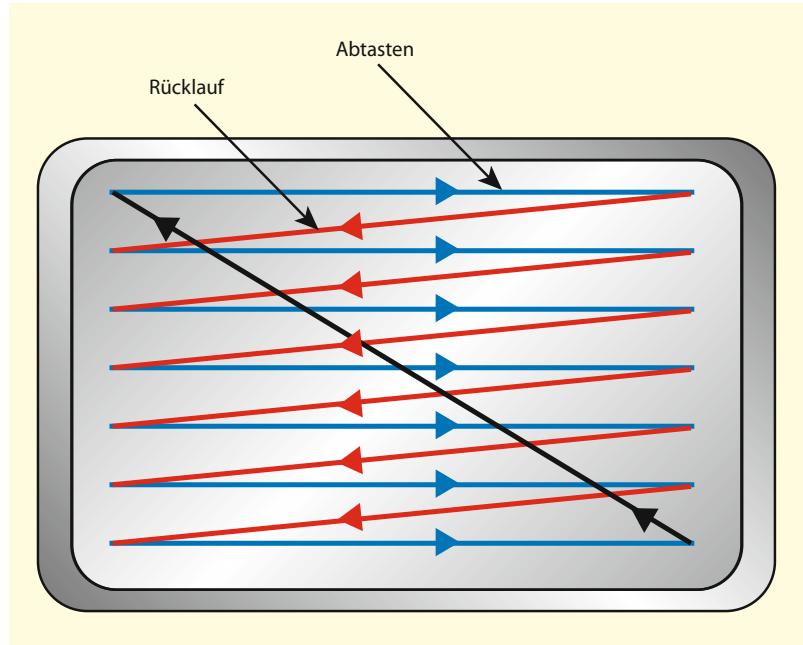
Sichtbarmachung im Nanomaßstab

Um Materialien auf atomarer Ebene manipulieren zu können, muss man einzelne Atome und Moleküle sehen können. Obwohl sich Moleküle auch mit einem Elektronenmikroskop sichtbar machen lassen, war es die Entwicklung von Rastersondenmikroskopen (RSM) (engl. *scanning probe microscopes*, SPM), die ein neues Feld für die Nanotechnologie eröffneten. Diese Geräte besitzen eine Sonde, die die zu untersuchende Oberfläche abtastet.

Alle Rastersondenmikroskope messen bestimmte Eigenschaften des Probenmaterials wie den elektrischen Widerstand, den Magnetismus, die Temperatur oder die Lichtabsorption mithilfe einer sehr feinen Spitze, die sehr dicht über der Probenoberfläche positioniert wird. Das Mikroskop führt die Sonde in einem vorgegebenen Raster (**Raster-Scan**) über die Oberfläche (Abb. 7.2), wobei die gewünschte Eigenschaft gemessen wird. Die Daten werden als gerastertes Bild, ähnlich dem auf einem Fernsehbildschirm, dargestellt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Mikroskopen nutzen diese Geräte kein Linsensystem, sodass hier auch nicht die Lichtbrechung die Auflösung

7.2 Prinzip des Raster-Scans

Beim Raster-Scan bewegt sich die Sonde über der Zielregion hin und her. Die Sonde tastet nur ab, wenn sie sich in eine Richtung bewegt („Abtasten“). In die andere Richtung bewegt sie sich schneller und ohne Kontakt zur Probe („Rücklauf“).



begrenzt, sondern die Größe der Sonde. Mit einigen dieser Mikroskope lassen sich die Proben nicht nur sichtbar machen, sondern auch verändern.

Das erste Rastersondenmikroskop war das **Rastertunnelmikroskop (RTM)** (engl. *scanning tunneling microscope*, STM), das Gerd Binnig und Heinrich Rohrer von IBM (s. folgender Abschnitt) entwickelten, wofür sie im Jahre 1986 den Nobelpreis erhielten. Das RTM schickt Elektronen, also elektrischen Strom, durch die Probe und misst auf diese Weise den elektrischen Widerstand. Das **Rasterkraftmikroskop (RKM)** (engl. *atomic force microscope*, AFM) ist in der Biologie besonders nützlich und misst die Kräfte, die zwischen der Sondenspitze und der Probe wirken.

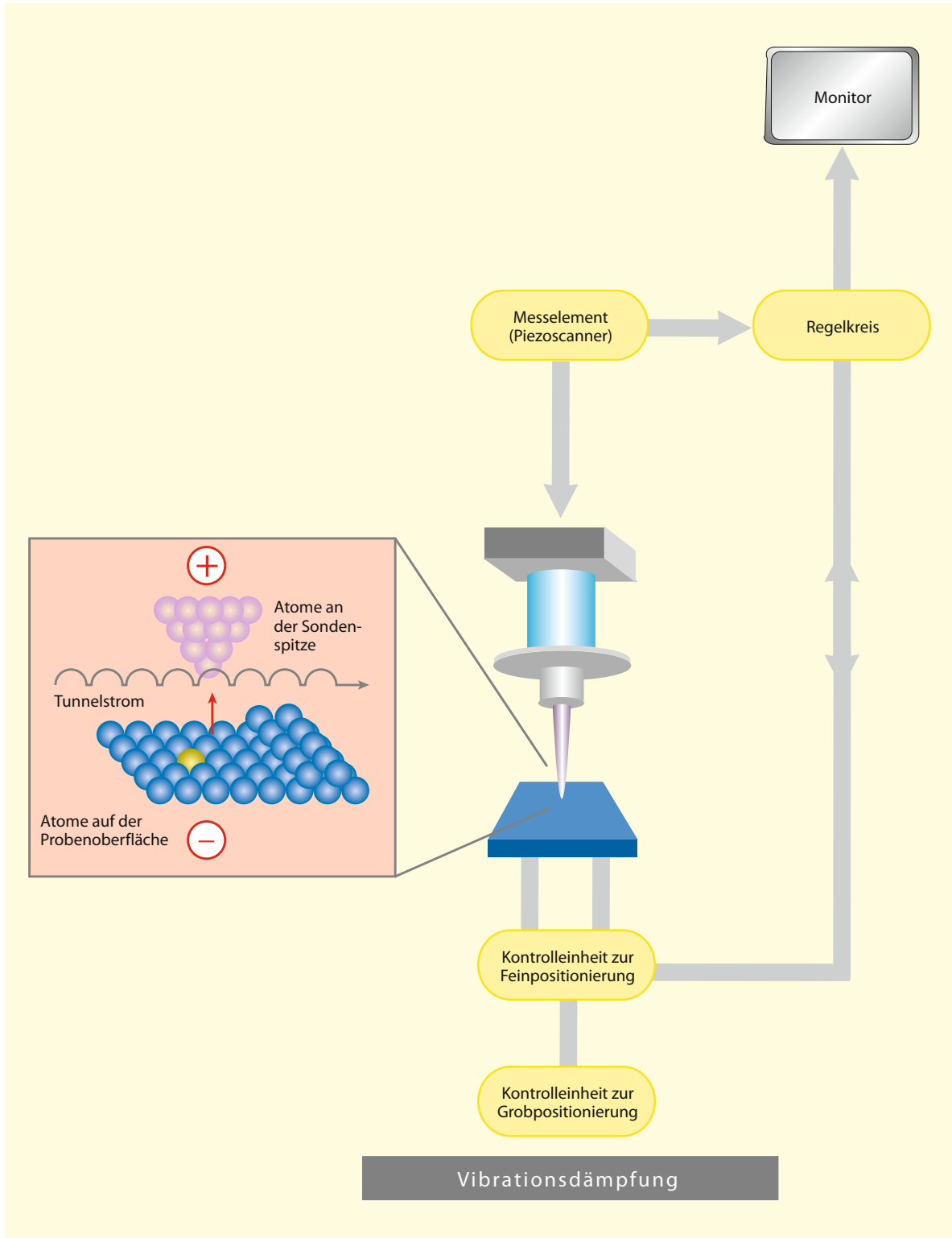
Die Sichtbarmachung einzelner Moleküle oder Atome ist mithilfe von Rastersondenmikroskopen möglich.

Rastertunnelmikroskopie

Wird eine Metallspitze sehr dicht an eine leitende Oberfläche herangeführt, dann fließen zwischen Spitze und Oberfläche Elektronen (der sog. Tun-

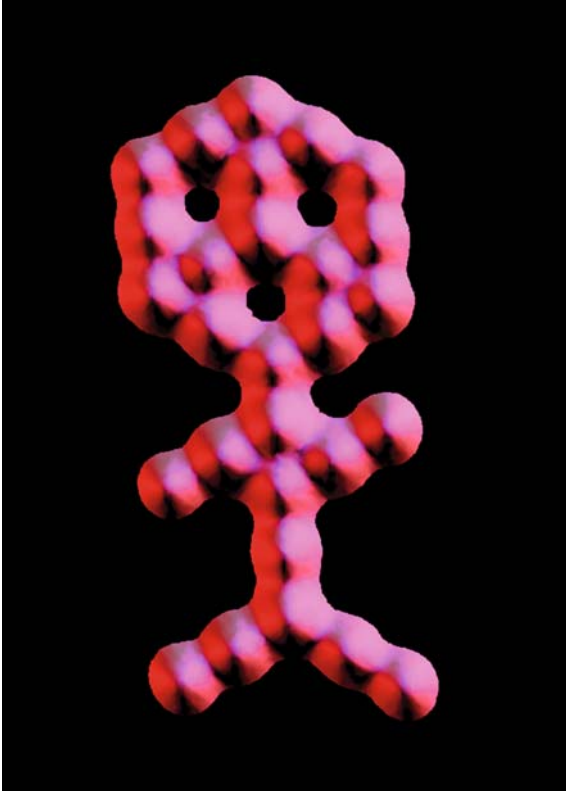
nelstrom). Die Stärke des Tunnelstromes ist exponentiell abhängig von dem Abstand zwischen Spitze und Oberfläche. Oberflächenkonturen lassen sich kartieren, indem ein Regelkreis angeschlossen wird, der dafür sorgt, dass der Tunnelstrom immer konstant bleibt, während die Spitze über der Oberfläche schwebt. Durch Heben und Senken der Spitze beim Abtasten der Probe erhält man Informationen über die Topographie der Oberfläche im atomaren Maßstab (Abb. 7.3).

Mithilfe eines RTM lassen sich Atome auch bewegen. Im Jahr 1989 führten D. M. Eigler und E. K. Schweizer das wahrscheinlich aufsehenerregendste Experiment der Nanotechnologie durch, indem sie 35 Xenonatome auf einer Nickeloberfläche zum IBM-Logo anordneten. Sie wählten Nickel, da hier die Täler zwischen den Reihen aus Nickelatomen ausreichend tief sind, um die Xenonatome an ihrem Platz zu halten. Die Täler sind also auch flach genug, sodass sich die Xenonatome über die Oberfläche ziehen lassen. Um die Xenonatome zu bewegen, wurde die RTM-Spitze im *imaging mode* des Mikroskops über einem Xenonatom platziert. Als nächstes schaltete man den *scanning mode* aus und die Spitze wurde abgesenkt, bis der Tunnelstrom um ein Vielfaches angestiegen war (*fabrication mode*). Das Xenonatom wurde von der RTM-Spitze angezogen und durch eine horizontale Bewegung an seinen neuen Platz



7.3 Prinzip eines Rastertunnelmikroskops (RTM)

In dem Ausschnitt sind Sondenspitze und Oberflächenatome dargestellt.



7.4 Der Kohlenmonoxidmann von Zeppenfeld

Die Atome wurden mithilfe eines RTM angeordnet. Der Mann besteht aus Kohlenmonoxid auf einer Platinoberfläche. Mit freundlicher Genehmigung von International Business Machines Corporation © 1995, IBM.

gebracht. Dort wurde der Tunnelstrom reduziert und das Atom abgelegt. Seitdem wurden viele Diagramme auf diese Weise erstellt. Der Kohlenmonoxidmann ist in Abbildung 7.4 dargestellt.

Aus biologischer Sicht hat das RTM den Nachteil, dass sich nur elektrisch leitende Oberflächen untersuchen lassen, in der Praxis handelt es sich dabei in der Regel um Metallschichten. Ein Rasterkraftmikroskop (s. folgender Abschnitt) hat den Vorteil, dass das Material nicht leitfähig sein muss. Es findet daher in der Biologie ein breites Anwendungsgebiet.

Das Rastertunnelmikroskop lässt sich einsetzen, um einzelne Atome einer elektrisch leitenden Oberfläche sichtbar zu machen oder sie zu bewegen.

Rasterkraftmikroskopie

Für die Sichtbarmachung im Nanomaßstab nutzt man häufig ein Rasterkraftmikroskop (RKM). Wie der Name schon sagt, beruht das Verfahren auf der Messung einer mechanischen Wechselwirkung und nicht auf der Messung fließender Partikel, seien es Photonen wie bei der Lichtmikroskopie oder Elektronen wie bei der Elektronenmikroskopie.

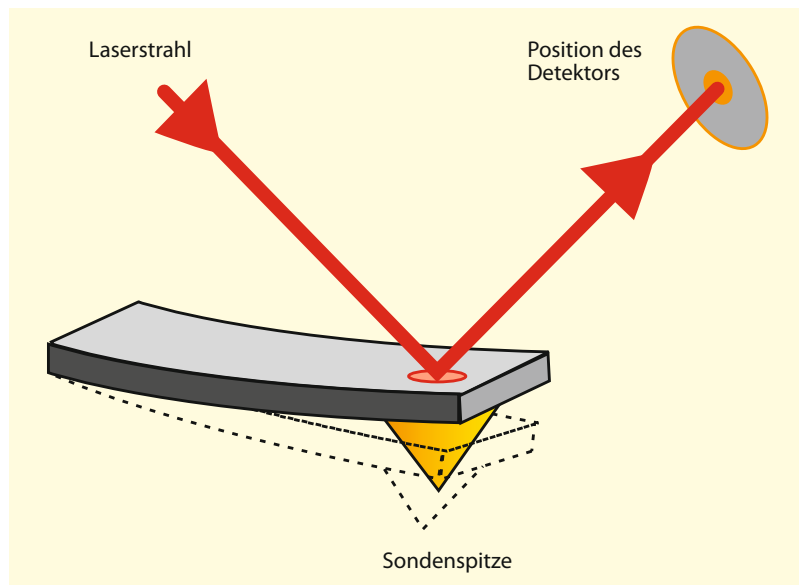
Physiker vergleichen die Arbeitsweise eines RKM häufig mit der eines altmodischen Plattenspielers, bei dem eine Nadel über die Oberfläche der Schallplatte kratzt. Für einen Biologen ist der Unterschied zwischen einem Lichtmikroskop und einem RKM ähnlich dem Unterschied zwischen dem Lesen eines Textes mit den Augen und dem Erasten der Blindenschrift mit den Fingerspitzen.

Das Rasterkraftmikroskop wurde im Jahr 1985 von Gerd Binnig, Calvin Quate und Christof Gerber entwickelt. Bei dem RKM gleitet eine feine Spitze, die an einem Träger angebracht ist, über die Oberfläche einer Probe. Durch die zwischen Spitze und Probe auftretenden Kräfte biegt sich ein Federbalken (engl. *cantilever*) und diese Biegung wird dokumentiert. Die Spitze wird in einem vorgegebenen Raster über die Oberfläche geführt und das entstehende Bild der Oberflächentopographie wird auf einem Monitor dargestellt.

Während des Abtastens werden die Spitze oder die Probe durch ein sehr genau arbeitendes Stellelement aus **piezoelektrischer Keramik** bewegt. (Dieses Material verändert die Form als Reaktion auf eine angelegte Spannung.) Das Stellelement hat in der Regel die Form eines Röhrchens, das sich in alle drei räumlichen Dimensionen im Sub-Ångström-Bereich zu bewegen vermag.

Die RKM-Sonde befindet sich am Ende eines biegsamen Federbalkens. Auf diesen Federbalken ist ein Laserstrahl gerichtet, der abgelenkt wird, wenn sich der Federbalken aufgrund der auf die Spitze wirkenden Kraft biegt. Die Biegung lässt sich dann anhand der Ablenkung des Laserstrahls messen, wie in Abbildung 7.5 dargestellt ist. Der Laserstrahl wird auf eine geteilte Photodiode gelenkt und die Unterschiede zwischen dem A- und dem B-Signal sind ein Maß für die Biegung des Federbalkens. Kleine Veränderungen sind dabei proportional zur aufgewendeten Kraft. Die Kraft zwischen Spitze und Probe lässt sich somit bestimmen.

Der Abstand zwischen Spitze und Probe wird so eingestellt, dass er im Bereich der Abstoßung



7.5 Das Rasterkraftmikroskop (RKM)

Die Auslenkung der Sondenspitze durch die Probenoberfläche wird mithilfe eines Lasers gemessen.

der intramolekularen Kraftkurve liegt. Das bedeutet, dass die RKM-Sonde durch ihre molekulare Wechselwirkung von der zu untersuchenden Oberfläche abgestoßen wird. Durch die Abstoßung lässt sich die Oberflächentopographie messen und in einer Abbildung darstellen, in der Farben die relativen Höhen anzeigen. Es ist möglich, die Oberfläche nach ihren topographischen Gegebenheiten abzusuchen, anschließend die RKM-Sonde anzuheben und die Oberfläche ein weiteres Mal nach elektrostatischen oder magnetischen Kräften abzutasten. Diese Ergebnisse können ebenfalls graphisch dargestellt werden und lassen sich mit den topographischen Gegebenheiten vergleichen.

Wie bei dem RTM ist es auch mit dem RKM möglich, einzelne Atome zu bewegen, obwohl dies nur einmal im Jahr 2003 gelang. Forscher der Universität von Osaka, Japan, entfernten ein einzelnes Siliziumatom aus einer Oberfläche und ersetzten es.

Durch den Einsatz eines RKM ist es möglich, polymere biologische Moleküle wie DNA oder Cellulose sichtbar zu machen und sogar einzelne Monomere (bei hoher Auflösung sogar Atome) zu betrachten.

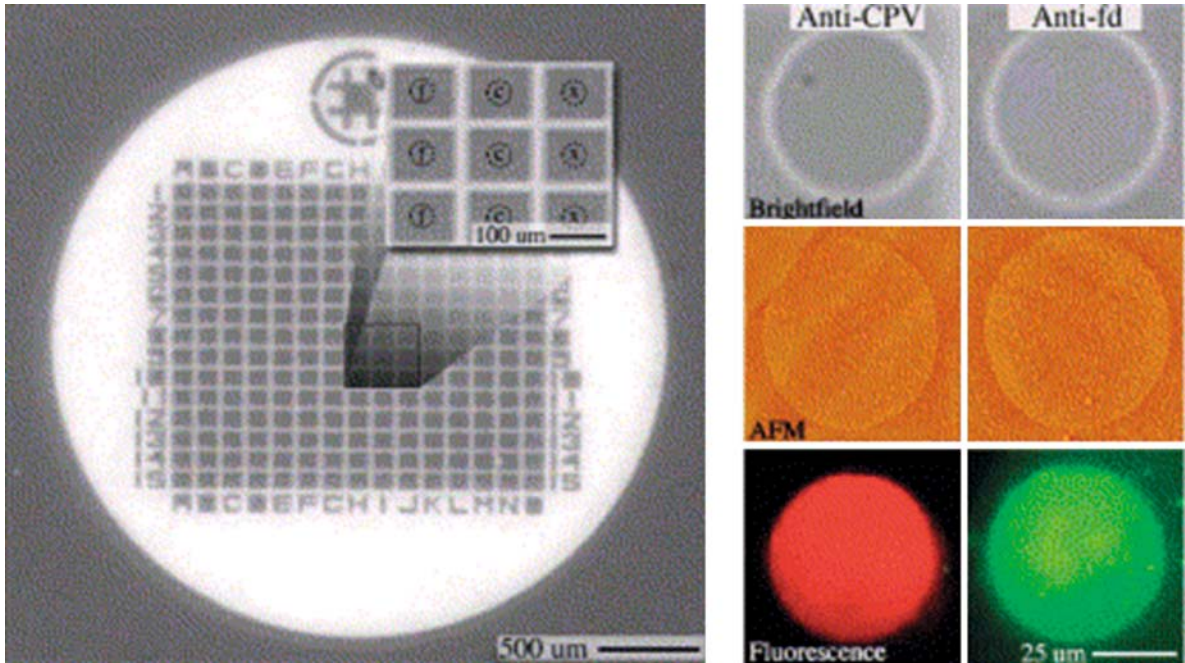
Das Rasterkraftmikroskop kann Atome oder Moleküle detektieren, indem eine Oberfläche hinsichtlich ihrer Topographie oder ihrer elektromagnetischen Eigenschaften abgetastet wird.

Nachweis von Viren mittels Rasterkraftmikroskopie

Ein Rasterkraftmikroskop (RKM) lässt sich einsetzen, um die Anwesenheit von Viruspartikeln nachzuweisen, dafür ist allerdings ein sogenannter „ViriChip“ notwendig. Dabei handelt es sich um einen Siliziumchip, der mit Antikörpern gegen das interessierende Virus beschichtet ist. In der Praxis ist der Chip in Bereiche aufgeteilt, die mit verschiedenen Antikörpern beschichtet werden, damit viele Viren gleichzeitig nachgewiesen werden können. Von der zu untersuchenden Probe wird ein Mikroliter auf den Chip aufgetragen und jedes Virus, das von den Antikörpern auf dem Chip erkannt wird, wird auf dem Chip gebunden. Die Chipoberfläche wird nun mithilfe eines RKM abgetastet, um die Anwesenheit von Viruspartikeln zu prüfen, die sich durch den Ort ihrer Bindung auf dem Chip identifizieren lassen (Abb. 7.6).

Der Chip wurde bereits erfolgreich mit einer Vielzahl von Viren, einschließlich humanpathogener Viren, getestet und wird zurzeit noch weiterentwickelt. Grundsätzlich sollte es möglich sein, Tausende von verschiedenen Viren mithilfe eines einzigen Chips nachzuweisen. Nur ein Tropfen Blut eines Patienten könnte dann auf viele Viren getestet werden.

Die Rasterkraftmikroskopie vermag einzelne Viren nachzuweisen und zu identifizieren.



7.6 Prinzip des ViriChips

Links: Eine mikroskopische Aufnahme des ViriChips. Der Ausschnitt zeigt die Anordnung der Felder mit den fixierten Antikörpern (dargestellt ist ein Bereich mit 3×3 Feldern). Rechts: Zwei Felder mit Antikörpern (Anti-fd und Anti-CPV) in höherer Auflösung, aufgenommen mit einem Hellfeldmikroskop (oben), einem RKM (Mitte, $Z = 15$ nm) und einem Fluoreszenzmikroskop (unten). Für die Fluoreszenzfärbung wurden Anti-CPV aus der Maus und Anti-fd aus dem Kaninchen verwendet, und anschließend Anti-Maus-IgG (markiert mit Alexa 594, rot) und Anti-Kaninchen IgG (markiert mit Cy2, grün). Der Durchmesser jedes Ausschnittes beträgt $60 \mu\text{m}$. Aus: Nettikadan et al (2003) Virus particle detection by solid phase immunocapture and atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 540–545. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.

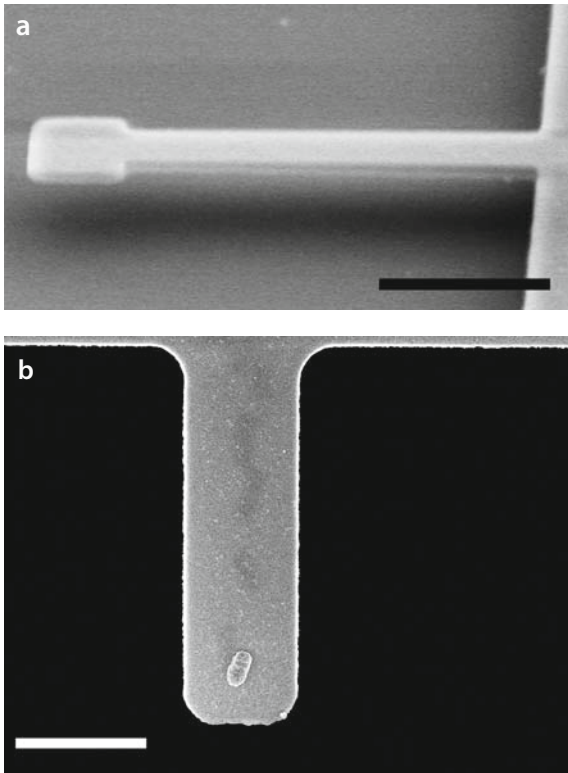
Das Wiegen einzelner Bakterien und Viruspartikel

Seit Jahren ist bekannt, dass Bakterien eine Größe von etwa 1000 nm besitzen und etwa 1 pg wiegen. Durch die Nanotechnologie ist nicht nur der Nachweis von Mikroorganismen möglich, sie können auch einzeln gewogen werden.

Die Resonanzfrequenz eines rechteckigen Federbalkens ist abhängig von der einwirkenden Masse. Es ist möglich, den Federbalken so zu verkleinern, dass er nur noch einige Mikrometer groß ist (mit einer Länge von $6 \mu\text{m}$, einer Breite von $0,5 \mu\text{m}$ und einer Plattform am Ende, die einen Durchmesser von etwa $1 \mu\text{m}$ hat). Die Resonanzfrequenz lässt sich mithilfe eines Lasers und der auftretenden Veränderung der Lichtreflexion messen. Die Platzie-

rung einer einzelnen Bakterienzelle oder sogar eines Viruspartikels verändert die Resonanzfrequenz des Federbalkens. Auf diese Weise wurden im Labor von Harold Craighead an der Cornell University die Massen von einzelnen Zellen oder Viren bestimmt (Abb. 7.7).

Um ein Bakterium oder ein Virus zu fixieren, wird der Federbalken mit einem Antikörper beschichtet, der den zu wiegenden Mikroorganismus erkennt. Eine einzelne Zelle von *E. coli* mit einer Größe von 1430×730 Nanometer wiegt 665 fg (Femtogramm) ($665 \times 10^{-15} \text{ g}$). Viren (die etwa 1 fg wiegen) lassen sich nachweisen, wenn die Größe des Federbalkens weiter reduziert wird und die Messung im Vakuum stattfindet. Mitte 2005 wurde diese Technik so weit verfeinert, dass ein einzelnes Makromolekül gewogen werden konnte; es handelte sich um eine doppelsträngige DNA aus etwa 1500 bp (das ist ungefähr



7.7 Das Wiegen eines einzelnen Bakteriums

a Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Federbalkens mit einer Länge von $6\ \mu\text{m}$, einer Breite von $0,5\ \mu\text{m}$ und einer Plattform mit einem Durchmesser von $1 \times 1\ \mu\text{m}$. Der Größenbalken entspricht $2\ \mu\text{m}$. Ilic B et al (2004) Virus detection using nanoelectromechanical devices. *Appl Phys Lett* 95: 2604–2607. © 2004. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des American Institute of Physics. **b** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen *E. coli*-Zelle, die durch einen Antikörper auf dem Federbalken fixiert wird. Mit freundlicher Genehmigung der Graighead-Gruppe, Cornell University. Ilic B et al (2001) Single cell detection with micromechanical oscillators. *J Vac Sci Technol B*. 19: 2825–2828. © 2001. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des American Institute of Physics.

die Größe einer typischen codierenden Sequenz). Die Weiterentwicklung des Verfahrens dürfte die Messung kleiner Proteine oder anderer Moleküle möglich machen, deren Gewicht im Zeptogrammbereich ($10^{-21}\ \text{g}$) liegt.

Die Messung der Resonanzfrequenz eines Federbalkens mithilfe eines Lasers erlaubt es, einzelne Bakterien oder Viren zu wiegen.

Nanopartikel und ihre Anwendung

Fortschritte der Wissenschaft, das unglaublich Kleine sichtbar zu machen und zu messen, waren der Ursprung der Nanotechnologie. Es folgte der Aufbau von Strukturen im Nanomaßstab. Mittlerweile werden einfache Nanostrukturen für eine Vielzahl analytischer Zwecke eingesetzt und eine zweite Generation solcher Strukturen für den Einsatz im klinischen Bereich befindet sich in der Entwicklung.

Wie ihr Name schon andeutet sind **Nanopartikel** kleiner als ein Mikrometer – in der Praxis zwischen $100\ \text{nm}$ und $5\ \text{nm}$. Die Partikel sind in der Regel kugelförmig, doch auch Stäbchen, Platten und andere Formen werden eingesetzt. Sie können gefüllt oder auch hohl sein und aus einer Vielzahl von Materialien bestehen, die häufig in abgegrenzten Schichten mit unterschiedlicher Funktion übereinander gelagert sind. Typisch sind ein zentraler funktioneller Kern, eine Schutzschicht und eine äußere Schicht, die mit der biologischen Umgebung in Wechselwirkung tritt.

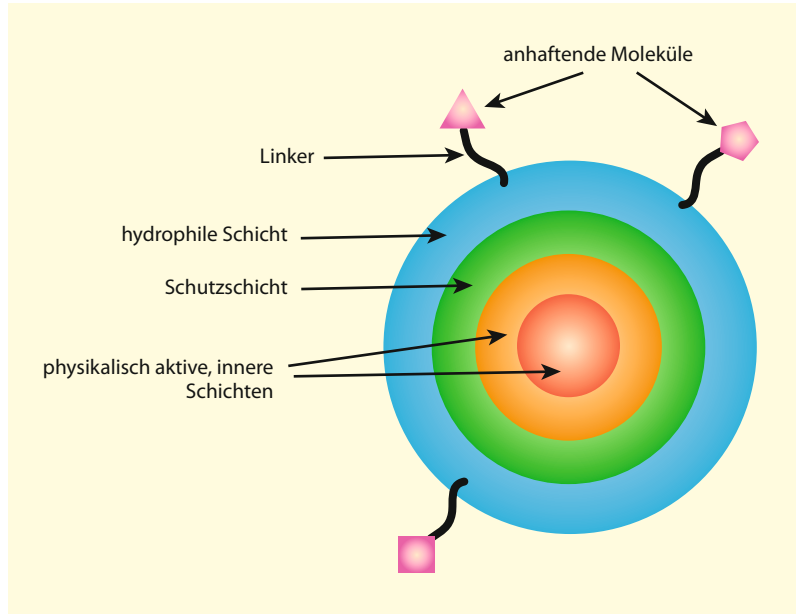
Der zentrale funktionelle Kern hat in der Regel nützliche optische oder magnetische Eigenschaften. Die bekannteste ist die Fluoreszenz. Die Schutzschicht schützt die funktionelle Schicht vor den schädigenden Einflüssen von Luft, Wasser oder Zellbestandteilen – sie schützt die Zelle auch vor allen toxischen Eigenschaften der funktionellen Schicht. Die äußere(n) Schicht(en) macht die Nanopartikel „biokompatibel“. Zu den erforderlichen Eigenschaften gehören in der Regel die Wasserlöslichkeit und die spezifische Erkennung. Für biologische Zwecke werden Nanopartikel häufig durch eine hydrophile äußere Schicht wasserlöslich gemacht. Außerdem müssen auf der Außenseite chemische Gruppen für eine spezifische Anheftung an andere Moleküle oder Strukturen vorhanden sein (Abb. 7.8).

Die Verwendungsmöglichkeiten von Nanopartikeln in der Biologie sind vielfältig:

- Fluoreszenzmarkierung und optische Codierung,
- Nachweis pathogener Mikroorganismen und/oder spezifischer Proteine,
- Reinigung und Manipulation biologischer Moleküle,
- Gezielte Verabreichung von Arzneimitteln und/oder Genen,
- Zerstörung von Tumoren auf chemischem oder thermischem Weg,
- Verstärkung des Kontrastes bei der Magnetresonanztomographie (MRT).

7.8 Typischer schichtweiser Aufbau eines Nanopartikels

Der physikalisch aktive Kern wird von mehreren Schichten umgeben. Häufig werden chemische Gruppen mit der Außenseite verknüpft, damit das Nanopartikel an andere biologische Moleküle binden kann.



Nanopartikel werden mittlerweile bei vielen biologischen Verfahren eingesetzt. Dazu gehören sowohl analytische als auch klinische Anwendungen.

Nanopartikel für die Markierung

Betrachten wir das lumineszierende CdSe-Nanostäbchen als Beispiel für ein Nanopartikel, das für Markierungen verwendet wird (Abb. 7.9). Diese Nanostäbchen (stabförmige Nanokristalle) lassen sich in der Molekularbiologie als Fluoreszenzmarker einsetzen, weil sie UV-Licht mit einer Wellenlänge von 550 nm absorbieren und Licht mit einer Wellenlänge von 590 nm emittieren. Sie wurden von Thomas Nann aus Freiberg, Deutschland, entwickelt.

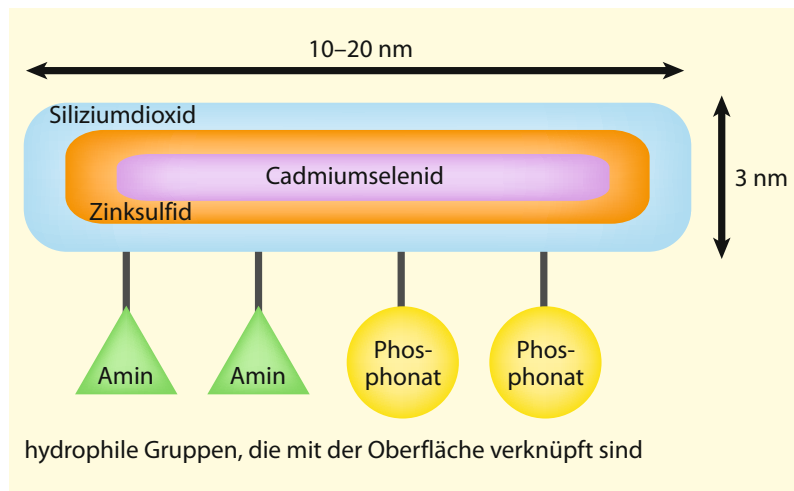
Die Nanostäbchen sind etwa 3 nm breit und 10 bis 20 nm lang. Sie haben einen Kern aus lumineszierendem Cadmiumselenid (CdSe), der von einer Schicht aus ZnS (Zinksulfid, Wurtzit) umgeben ist, die den Kern vor Oxidation schützt. Außen befindet sich eine Schicht aus Siliziumdioxid (Silica), über die Phosphonate oder Amine an das Nanostäb-

chen gekoppelt werden können. Diese hydrophilen Gruppen sorgen für die Wasserlöslichkeit der Stäbchen. Außerdem können die Nanostäbchen über diese äußeren chemischen Gruppen an Proteine binden.

Das Gerüst einer eukaryotischen Zelle ist aus zylindrischen Proteinstrukturen aufgebaut, die als Mikrotubuli bezeichnet werden. Diese werden häufig in ihre Monomere (Tubulin) zerlegt und an einem anderen Ort wieder aufgebaut. Mithilfe von **Nanostäbchen** lässt sich diese Umstrukturierung verfolgen, indem man sie mit Tubulinmonomeren verknüpft. Die Zugabe von Guanosintriphosphat (GTP) stimuliert den Zusammenbau der Mikrotubuli, und durch die fluoreszierenden Nanostäbchen lässt sich beobachten, wie sie sich zu linearen Strukturen zusammenlagern.

Warum verwendet man hier eine komplexe vielschichtige Nanostruktur statt eines einfachen Fluoreszenzfarbstoffes?

- a) Obwohl die Nanokristalle einen engen Bereich der Fluoreszenz haben, absorbieren sie doch ein relativ breites Spektrum an Licht (im Gegensatz zu dem engen Absorptionsspektrum eines typischen Fluoreszenzfarbstoffes). Somit bleichen sie während der Anregung nicht aus und lassen sich über einen langen Zeitraum bestrahlen und auch verfolgen.



7.9 CdSe-Nanostäbchen

Lumineszierende CdSe-Nanostäbchen sind von Schutzschichten aus Zinksulfid und Siliziumdioxid umgeben. Über hydrophile chemische Gruppen auf der Oberfläche lassen sich die Stäbchen mit Proteinen oder anderen biologischen Molekülen verknüpfen.

- b) Das von Nanokristallen emittierte Licht ist sehr hell – es ist das Produkt aus dem molaren Extinktionskoeffizienten und der Quantenausbeute. (Der **molare Extinktionskoeffizient** ist die Absorption einer einmolaren Lösung eines reinen gelösten Stoffes bei gegebener Wellenlänge; je höher er ist, umso mehr Licht wird absorbiert. Die **Quantenausbeute** ist der Quotient aus absorbierten Photonen und den während der Fluoreszenz emittierten Photonen.)
- c) Das Emissionsmaximum eines Nanokristalls ist abhängig von seiner Größe. Indem man einen Kristall einer bestimmten Größe herstellt, lässt sich jede beliebige Wellenlänge einstellen (s. unten).

Nanopartikel lassen sich ebenso spezifisch zu Geweben wie Krebszellen dirigieren, indem man entsprechende Antikörper oder Rezeptorproteine mit der Oberfläche der Partikel verknüpft. Fluoreszierende Nanopartikel werden häufig als Quantenpunkte (engl. *quantum dots*) bezeichnet und sind mittlerweile für viele Markierungen in der Biologie kommerziell erhältlich. Auch Fluoreszenzfarbstoffe können mit anderen Molekülen gekoppelt werden, doch sind Nanopartikel vielseitiger. Mit Quantenpunkten lassen sich DNA-Moleküle wie auch Proteine markieren. Die Kopplung von Quantenpunkten mit PCR-Primern ergibt fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte – ein Verfahren, das als *quantum dot-PCR* bezeichnet wird.

Um den Kontrast bei der Magnetresonanztomographie (MRT) zu verstärken, wurden viele Materialien eingesetzt. Zunehmend gehören dazu auch Na-

nopartikel, die verschiedene Materialien enthalten. So sind z.B. superparamagnetische Nanopartikel aus Eisenoxid, sog. SPIO-Nanopartikel (engl. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*), ein gutes Kontrastmittel für ein MRT. Ihre magnetischen Eigenschaften variieren mit der Partikelgröße. Größere Partikel mit einer Größe über 300 nm werden für den Darm, die Leber und die Milz eingesetzt. Kleinere Partikel mit einer Größe zwischen 20 und 40 nm sind genauer und besser für die Detektion von frühen Tumorstadien der Lymphknoten geeignet als herkömmliche Materialien.

Fluoreszierende Nanopartikel haben bei Markierungen in der Biologie ein breites Anwendungsspektrum. Sie sind stabiler als herkömmliche fluoreszierende Farbstoffe und häufig auch heller.

Exkurs 7.1

Terminologie im Trend

Nanopartikel werden mit einer Vielzahl von „Nanobegriffen“ bezeichnet wie Nanostäbchen, Nanokristalle, Nanokapseln, Nanoröhrchen, Nanokabel usw. abhängig von ihrer Form und Struktur. Hinzu kommen die Quantenpunkte, hinter denen sich fluoreszierende Nanokristalle verbergen, die ausreichend klein sind, um einen Quanteneinschluss (engl. *quantum confinement*) zu zeigen – sie können für Markierungen in der Biologie verwendet werden.

Größenquantisierungseffekt und Farben von Nanokristallen

Werden Materialien in ausreichend kleine Fragmente zerteilt, beginnen Quanteneffekte ihre physikalischen Eigenschaften zu beeinflussen. Die fluoreszierenden Nanopartikel sind **Halbleiter**, die ausreichend klein sind, um solche Quanteneffekte zu zeigen.

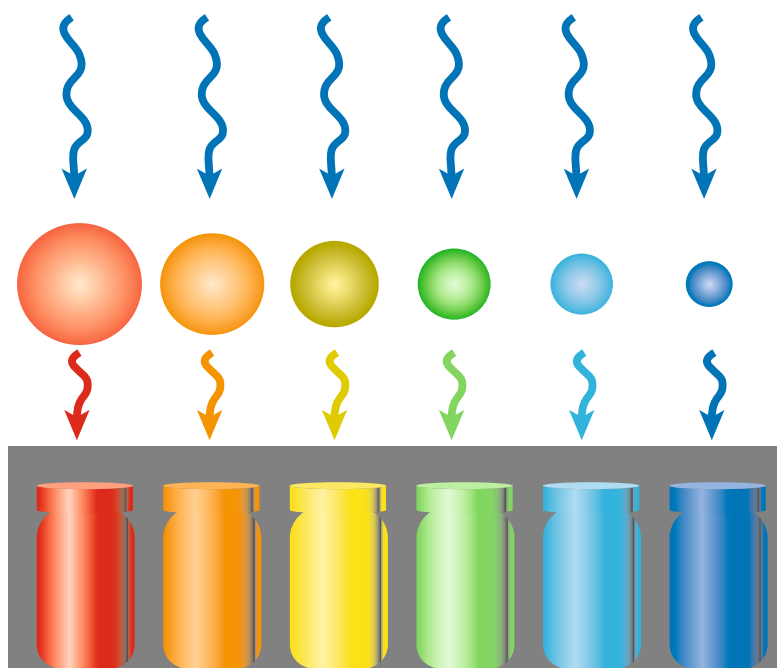
Halbleiter sind Substanzen, die nur unter bestimmten Bedingungen elektrischen Strom leiten. Bei Halbleitern des N-Typs besteht der Strom (wie bei normalen elektrischen Kabeln) aus negativ geladenen Elektronen. Bei Halbleitern des P-Typs besteht der Strom jedoch aus **Löchern**. Ein Loch entsteht, wenn einem Atom ein Elektron fehlt. Obwohl es im physikalischen Sinne keine Partikel sind, vermögen die Löcher von einem Atom zum nächsten zu wandern und dienen als Ladungsträger. Elektronen und Löcher können rekombinieren und sich so auslöschen, ein Prozess, bei dem Energie frei wird. Umgekehrt kann die Energie, die von verschiedenen Halbleitern absorbiert wird, ein Elektron von einem Atom lösen; gleichzeitig entsteht ein Loch, und Elektron und Loch können sich anschließend in unterschiedliche Richtungen bewegen.

Markierungen mit Nanopartikeln lassen sich unter Verwendung verschiedener Emissionswellenlängen herstellen, die den UV-Bereich, das sichtbare Spektrum und den Nah-Infrarot-Bereich abdecken. Die Emissionswellenlängen variieren abhängig vom Material des Halbleiters. Durch den Größenquantisierungseffekt (engl. *quantum size effect*, Abb. 7.10) ist es möglich, dass derselbe Halbleiter, abhängig von der Größe des Nanopartikels, verschiedene Wellenlängen emittiert. Je kleiner die Nanopartikel, umso geringer ist die abgestrahlte Wellenlänge (d.h. umso höher ist die Energie).

Fluoreszierende Nanopartikel sind eine Art miniaturisierte, lichtemittierende Dioden (LEDs). Dabei handelt es sich um Halbleiter, die Energie absorbieren (entweder elektrisch oder in Form von Licht), wodurch Paare aus Elektronen und Löchern entstehen. Rekombinieren die Elektronen wieder mit den Löchern, wird Licht emittiert. Bei Festkörpern hängen die Energie und damit die Wellenlänge des emittierten Lichts von der chemischen Zusammensetzung des Halbleiters ab. Im Nanomaßstab kommen allerdings Quanteneffekte zum Tragen. Ist die physikalische Größe des Halbleiters geringer als der natürliche Radius (der **Bohr-Radius**) des Elektron-Loch-Paares, dann muss zusätzlich Energie aufgebracht werden, um das Paar einzuschließen. Dieser Vorgang wird als **Quanteneinschluss** (engl. *quantum*

7.10 Größenquantisierungseffekt

Nanokristalle unterschiedlicher Größe absorbieren UV-Licht und emittieren Energie. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes hängt von der Größe des Nanokristalls ab. Je kleiner der Kristall, umso energiereicher ist das emittierte Licht. Aus: Riegler und Nann (2004) Application of luminescent nanocrystals as labels for biological molecules. *Anal Bioanal Chem* 379 (7–8): 913–919.



confinement) bezeichnet und tritt bei Nanokristallen mit einer Größe von 20 nm oder weniger auf. Je kleiner der Halbleiterkristall, umso mehr Energie ist erforderlich und umso energiereicher ist das emittierte Licht (d.h. umso kürzer ist seine Wellenlänge).

Die emittierte Wellenlänge eines fluoreszierenden Nanopartikels hängt von seiner Größe ab und lässt sich daher leicht manipulieren.

Nanopartikel für die Verabreichung von Arzneistoffen, DNA oder RNA

Da sich Nanopartikel spezifisch zu Geweben dirigieren lassen, können sie eingesetzt werden, um biologisch aktive Moleküle wie Arzneistoffe und gentechnische Konstrukte zu ihrem Bestimmungsort zu bringen.

Große polymere Moleküle wie DNA können selbst zu Nanopartikeln mit einer Größe von 50 bis 200 nm verdichtet werden. Hinzu kommt die Addition eines positiv geladenen Moleküls (z.B. eines kationischen Lipids oder Polylysin), um die negative Ladung der Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats zu neutralisieren. Andere Moleküle können hinzugefügt werden und erhöhen die Selektivität für bestimmte Zellen oder Gewebe.

Alternativ kann man hohle Nanopartikel (**Nanokapseln**) einsetzen, um kleinere Moleküle zu transportieren. Solche Nanokapseln müssen aus biokompatiblen Materialien wie Polyethylenimin (PEI) oder Chitosan bestehen. Letzteres wird zurzeit häufig eingesetzt, es ist natürlicher Herkunft und biologisch abbaubar. Chitin ist ein β -1,4-verknüpftes Polymer aus *N*-Acetyl-D-glucosamin, das in Zellwänden von Insekten und Pilzen vorkommt. Es ist nach der Cellulose das am häufigsten vorkommende Biopolymer. Aus Chitin lässt sich Chitosan herstellen, indem man durch Alkalibehandlung alle Acetylgruppen des Chitins entfernt.

Ein interessanter Ansatz verbindet zwei zurzeit aktuelle Technologien: die Nutzung von Nanokapseln für den Transport von siRNA (kurze interferierende RNA). Die gezielte Verabreichung von siRNA löst RNA-Interferenz aus, die zur Zerstörung einer Ziel-mRNA führt (s. Kap. 5). Die siRNA kann mRNA von

Genen zum Ziel haben, die hauptsächlich in Krebszellen exprimiert werden oder die für bestimmte Viren charakteristisch sind.

Hohle Nanopartikel lassen sich einsetzen, um DNA, RNA oder Protein gezielt an ihren Bestimmungsort zu bringen.

Nanopartikel in der Krebstherapie

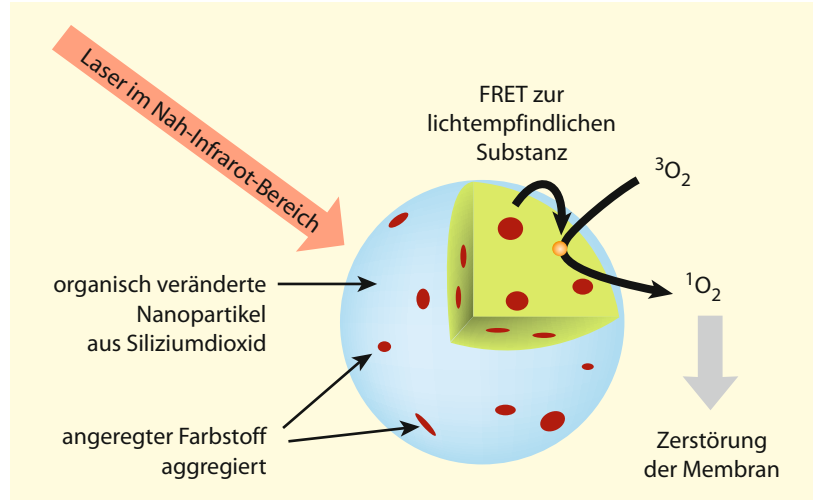
Tumorzellen können durch toxische Chemikalien oder durch lokale Hitzeeinwirkung zerstört werden. In beiden Fällen ist das Ziel, die wirksamen Agenzien gezielt zu den Krebszellen zu bringen, um gesundes Gewebe zu schützen. Werden toxische Substanzen eingesetzt, muss das Reagens nicht nur spezifisch zum Bestimmungsort transportiert werden, sondern darf auch nicht in das umliegende Gewebe diffundieren. Beides lässt sich realisieren, indem man hohle Nanopartikel für den Transport einsetzt. Nanopartikel können Tumore zum Ziel haben, indem man sie mit spezifischen Rezeptoren oder reaktiven Gruppen koppelt. Diese werden so gewählt, dass sie Proteine erkennen, die ausschließlich oder hauptsächlich auf der Oberfläche der Krebszellen vorkommen. Ziel ist eine orale Verabreichung dieser Nanopartikel.

Problematisch ist die Diffusion, doch sie lässt sich auf ein gewisses Maß beschränken, indem Nanopartikel konstruiert werden, die den Wirkstoff nur langsam freisetzen. Eine sinnvolle Alternative ist die Herstellung eines toxischen Wirkstoffes innerhalb des Nanopartikels, nachdem dieser in die Krebszelle geschleust wurde. Bei der photodynamischen Krebstherapie entsteht Singulett-Sauerstoff, indem ein Laser einen photosensitiven Farbstoff angeregt hat. Der Singulett-Sauerstoff ist hoch reaktiv und zerstört durch die Oxidation von Lipiden vor allem biologische Membranen. Nach der Diffusion aus dem Nanopartikel heraus, reagiert der toxische Sauerstoff so schnell, dass er die Krebszelle nicht verlässt (Abb. 7.11).

Nanopartikel lassen sich auch einsetzen, um Krebszellen durch lokale Hitzeeinwirkung abzutöten. Eine Möglichkeit ist die Verwendung eines magnetischen Kerns. Ein wechselndes Magnetfeld liefert die Energie und heizt die Nanopartikel auf eine Tempe-

7.11 Nanopartikel für die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff

Der Laser, der Licht im Nah-Infrarot-Bereich abstrahlt, regt den Farbstoff an, der Teil des Nanopartikels ist. Die Energieübertragung auf die lichtempfindliche Substanz mittels FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) wandelt normalen (Triplett-)Sauerstoff in Singulett-Sauerstoff um.



ratur auf, die für Säugerzellen tödlich ist. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von Nanokapseln, deren Kern (häufig aus Siliziumdioxid) von einer dünnen Metallschicht (z.B. aus Gold) umgeben ist. Durch Veränderung des Kerndurchmessers und der Dicke der Metallschicht ist es möglich, solche Nanopartikel so einzustellen, dass sie aus jedem Bereich des Spektrums, angefangen bei UV-Licht über den sichtbaren Bereich bis hin zum Infrarot, Licht absorbieren. Da lebende Gewebe am wenigsten im Nah-Infrarot-Bereich absorbieren, werden die Nanopartikel so konstruiert, dass sie Strahlungsenergie aus diesem Bereich des Spektrums absorbieren. Eine Bestrahlung mit den entsprechenden Wellenlängen heizt auf diese Weise das umgebende Gewebe auf.

Nanopartikel lassen sich einsetzen, um Krebszellen durch lokale Hitzeeinwirkung oder Freisetzung eines toxischen Produkts abzutöten.

Zusammenbau von Nanokristallen durch Mikroorganismen

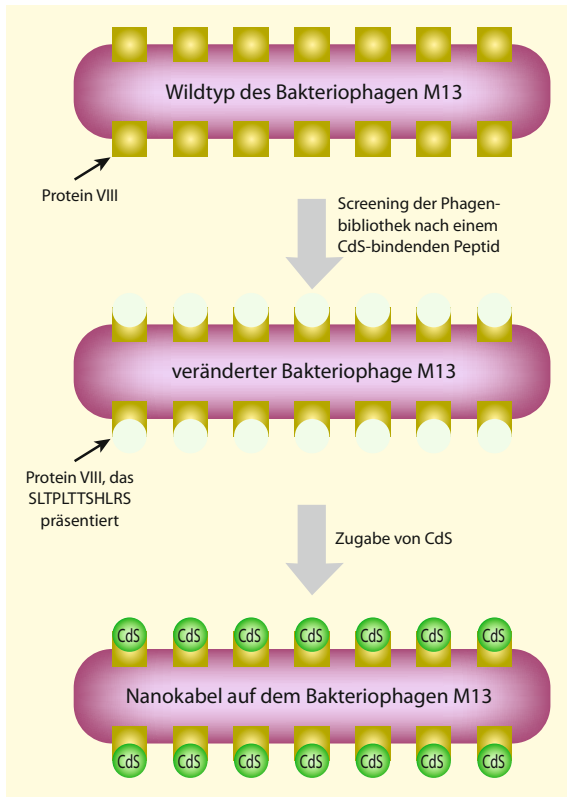
Seit vielen Jahren ist bekannt, dass Bakterien eine Vielzahl von metallischen Elementen anreichern und sie, in der Regel durch Oxidation oder Reduktion, chemisch modifizieren. So können Bakterien z.B. Se-

len- oder Telluranionen anreichern und zu elementarem Selen oder Tellur reduzieren, die entweder als Präzipitat auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren abgelagert werden. Bestimmte Arten des Bakteriums *Pseudomonas*, die in metallkontaminierten Böden vorkommen, und auch der Pilz *Verticillium* können Nanokristalle aus Silber bilden.

Wie man erst kürzlich entdeckte, fallen Partikel aus Cadmiumsulfid mit einer Größe von 2 bis 5 nm aus, wenn *Escherichia coli* in einem cadmiumchlorid- und natriumsulfidhaltigen Medium kultiviert wird. Mit anderen Worten: Bakterien „synthetisieren“ auf biologischem Wege Halbleiternanokristalle.

Noch raffinierter ist die Anwendung eines Phagen-Displays für die Selektion von Peptiden, die Halbleiternanokabel aufbauen können. Wie in Kapitel 9 beschrieben, ist das Phagen-Display eine Methode, mit deren Hilfe sich Peptide selektieren lassen, die an bestimmte, ausgewählte Zielmoleküle binden. DNA-Abschnitte, die eine Bibliothek aus Peptidsequenzen codieren, werden mit einem Gen für ein Hüllprotein eines Bakteriophagen fusioniert. Die zusätzliche Sequenz wird entweder an den C- oder N-Terminus des Proteins geheftet, wo sie die normale Funktion des Hüllproteins nicht stört. Wird das Hybridprotein in das Phagencapsid eingebaut, dann werden die entsprechenden Peptide auf der Außenseite des Phagenpartikels präsentiert. Die Phagenbibliothek wird anschließend auf die Bindung an ein Zielmolekül hin untersucht und die bindenden Phagen weiter analysiert.

Phagen-Display-Bibliotheken wurden auch mit dem Ziel durchsucht, Peptide zu finden, die an ZnS-



7.12 Zusammenbau eines Nanokabels durch einen Bakteriophagen

Das Phagen-Display liefert gentechnisch veränderte Varianten des M13-Hüllproteins (Protein VIII), mit eingebauten Peptiden. Einige dieser Peptide vermögen CdS zu binden. In Anwesenheit von CdS-Kristallen bildet sich auf der Oberfläche des Bakteriophagen ein Nanokabel.

oder CdS-Nanokristalle binden. Für die Fusion mit dem Peptid verwendete man das Protein VIII aus dem Bakteriophagen M13. ZnS wurde durch das Peptid VISNHAGSSRRL gebunden und CdS von dem Peptid SLTPLTTSHLRS. Da das Capsid des Bakteriophagen mehrere Kopien des Hüllproteins enthält, werden auch viele Kopien des Peptids präsentiert. Auf der Phagenoberfläche ordnen sich also mehrere Nanokristalle an und da M13 ein filamentöser Phage ist, ist das Ergebnis ein Halbleiterkabel (Abb. 7.12).

Nanokristalle und Nanokabel können auch von nichtmodifizierten Bakterien oder durch den Einsatz raffinierter Phagen-Display-Verfahren zusammengesetzt werden.

Nanoröhrchen

Nanoröhrchen aus Kohlenstoff sind Zylinder, die aus reinem Kohlenstoff bestehen und einen Durchmesser zwischen 1 bis 50 nm und eine Länge von bis zu 10 μm haben. Reiner, elementarer Kohlenstoff liegt in Diamanten oder als Graphit vor. Im Diamanten ist jedes C-Atom kovalent mit vier anderen Kohlenstoffatomen verbunden, sodass ein dreidimensionales, extrem stabiles, tetraedrisches Kristallgitter entsteht. Graphit besteht dagegen aus flachen Lagen von hexagonal angeordneten C-Atomen. Innerhalb der Graphitschichten ist jedes C-Atom kovalent mit drei Nachbaratomen verbunden. Die Lagen verschieben sich seitwärts übereinander, weil sich zwischen den Atomen der einzelnen Schichten keine Bindungen ausbilden.

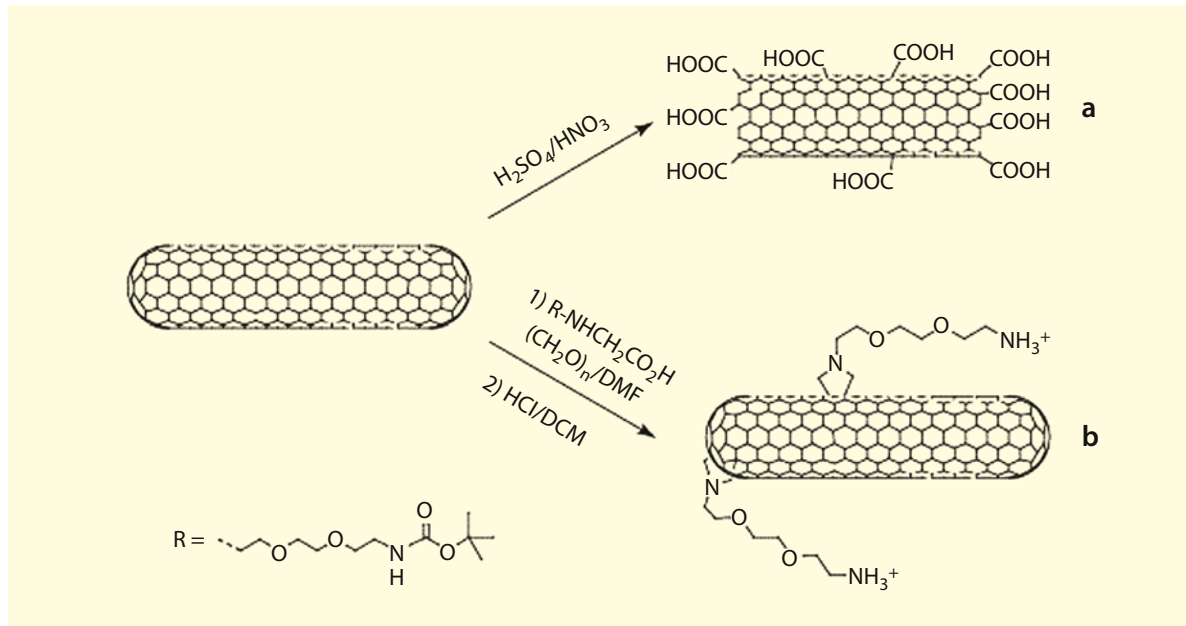
Um ein Nanoröhrchen herzustellen, wird eine einzelne Graphitschicht zu einem Zylinder aufgerollt. Die Schichten können gerade oder in einem bestimmten Winkel zum Kohlenstoffgitter gerollt sein und Röhrchen mit unterschiedlichen Durchmessern bilden. Abhängig vom Durchmesser und der angelegten Spannung, können die Nanoröhrchen als metallische Leiter oder Halbleiter fungieren. Es überrascht nicht, dass die Röhrchen in der Elektronik reichlich Anwendung finden, ein Thema, das den Rahmen dieses Buches allerdings sprengen würde.

In der Biotechnologie steht der Einsatz der Nanoröhrchen noch am Anfang, doch zukünftig sollen andere Biomoleküle wie Enzyme, Hormonrezeptoren oder Antikörper mit der Oberfläche der Röhrchen verknüpft werden. Ein Ziel ist, Biosensoren zu konstruieren, bei denen z.B. die Wechselwirkung eines Antikörpers mit seinem Antigen das elektrische Verhalten des Nanoröhrchens ändert. Die Bindung von Hormonen, Pathogenen, Verunreinigungen usw. soll ein elektrisches Signal generieren.

Eines der wichtigsten Probleme bei der Kopplung der Röhrchen an Proteine ist die Hydrophobizität der Nanoröhrchenoberfläche. Eine Lösung ist, zunächst die Oberfläche durch die Zugabe von nichtionischen Detergenzien wie Triton-X100 zu verändern. Der hydrophobe Bereich des Detergens bindet an die Röhrchenoberfläche und die hydrophile Region bindet die Proteine. Alternativ lassen sich auch chemische Reagenzien einsetzen, die mit der Kohlenstoffoberfläche reagieren und Seitenketten ausbilden, die reaktive funktionelle Gruppen tragen. Proteine können dann durch eine Reaktion mit diesen Gruppen angehängt werden (Abb. 7.13). Die Konstruktion von

Maschinen durch die Kombination von biologischen Molekülen mit Nanoröhrchen steckt noch in den Kinderschuhen, doch der Fortschritt auf diesem Gebiet ist rasant.

Es lassen sich hohle Nanoröhrchen herstellen, die verschiedene, biologisch nützliche Seitenketten tragen.



7.13 Die Verknüpfung von Nanoröhrchen mit funktionellen organischen Gruppen

a Nanoröhrchen aus Kohlenstoff werden mit Säure behandelt, um sie zu reinigen und um Carboxylgruppen herzustellen. **b** Alternativ können sie mit Aminosäurederivaten und Aldehyden reagieren, um komplexere hydrophile Gruppen mit der äußeren Oberfläche zu verknüpfen. Aus: Bianco, Kostarelos und Prato (2005) Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol* 9: 674–679. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.

Exkurs 7.2

Magnetosomen: natürliche, magnetische Nanopartikel aus Bakterien

Natürlich vorkommende, magnetische Nanopartikel werden von magnetotaktischen Bakterien wie *Magnetospirillum* gebildet. Diese Mikroorganismen können Magnetfelder wahrnehmen und orientieren sich an ihnen. Die Organismen enthalten **Magnetosomen**, die aus Kristallen aus magnetischem Eisenoxid (Magnetit, Fe_3O_4) in Nanogröße oder, was seltener der Fall ist, aus Eisensulfid (Greigit, Fe_3S_4) bestehen, eingehüllt in Protein. Die Magnetosomen ordnen sich entlang der Zellachse in einer Reihe an. Die Synthese der Proteinhülle und die Mineralisierung des magnetischen Kerns werden genetisch kontrolliert. Zumindest in einigen Fällen bilden Gene, die für die Bildung von Magnetosomen verantwortlich sind, auf dem bakteriellen Chromosom Cluster.

Es ist möglich, andere Moleküle mit der Außenseite eines Magnetosoms zu verbinden, indem man die Proteinhülle der Magnetosomen gentechnisch verändert. Im Labor von Dr. Tadashi Matsunaga der University of Agriculture and Technology in Tokyo wurde das Gen für das Mms16-Protein von *Magnetospirillum magneticum* mit den Genen für Luciferase und den Dopaminrezeptor fusioniert. Die fusionierten Proteine wurden auf der Oberfläche des Magnetosoms präsentiert. Nach der Zerstörung der Bakterienzelle konnte man die Magnetosomen, die die Fremdproteine trugen, durch magnetische Wechselwirkungen isolieren. Dadurch wird die Analyse membrangebundener Rezeptoren wie denen des menschlichen Nervensystems erleichtert.

Antibakterielle Nanoschichten

Nanoschichten werden durch viele Nanoröhrchen gebildet, die so nebeneinander ausgerichtet sind, dass die Achsen ihrer Zylinder parallel zueinander stehen. Nanoschichten, die Farben verändern und Bakterien abtöten, wurden aus speziell konstruierten Lipiden geschaffen, die sich in Abhängigkeit von den Bedingungen zu einer Vielzahl von Nanostrukturen zusammenlagern. In Wasser entstehen Nanoröhrchen. Durch partielle Rehydrierung getrockneter Nanoröhrchen lagern sich die Röhrchen Seite an Seite nebeneinander, und es bildet sich eine Nanoschicht.

Das Lipid besteht aus einer langen Kohlenwasserstoffkette (C_{25}) mit einer Diacetylengruppe in der Mitte. Ein einzelnes Nanoröhrchen hat einen Durchmesser von etwa 100 nm und ist etwa 1000 nm lang. Die Wände der Nanoröhrchen bestehen aus fünf Lipiddoppelschichten. Beide, sowohl die einzelnen Lipidmoleküle als auch die zusammengesetzte Schicht, töten Bakterien ab. Wie andere langkettige Aminoverbindungen auch, wirken sie als Detergenzien und zerstören die Zellmembran. Somit stellt die Nanoschicht eine Oberfläche dar, die für Bakterien tödlich ist. Diese Eigenschaft könnte sehr nützlich sein für die Anwendung der Nanoschichten in der Biomedizin.

Diacetylenverbindungen haben die interessante Eigenschaft, ihre Farbe zu verändern. Zu Beginn ist die Nanoschicht weiß, trifft jedoch UV-Licht auf, färbt sich die Schicht in tiefes Blau. Die UV-Strahlung führt zu Quervernetzungen zwischen den Acetylengruppen und benachbarten Molekülen und die Polymerisierung stabilisiert die Schicht. Blaue Nanoschichten verändern ihre Farbe als Reaktion auf eine Vielzahl von Substanzen. Detergenzien und Säuren färben sie von blau nach rot oder gelb, und die Anwesenheit von Bakterien wie *E. coli* ergibt Rot- oder Rosatöne. Solche Materialien ließen sich sowohl als Biosensoren als auch zum Schutz gegen bakterielle Kontamination einsetzen.

Nanoröhrchen lassen sich zu Schichten arrangieren, und es entstehen Oberflächen, die antibakteriell wirken oder als Biosensoren eingesetzt werden können.

Nachweis von Viren durch Nanokabel

Nanokabel haben einen Durchmesser im Nanobereich, doch sie können mehrere Mikrometer lang sein. Sie können metallisch sein und als elektrische Leiter dienen, oder sie bestehen aus halbleitenden Materialien.

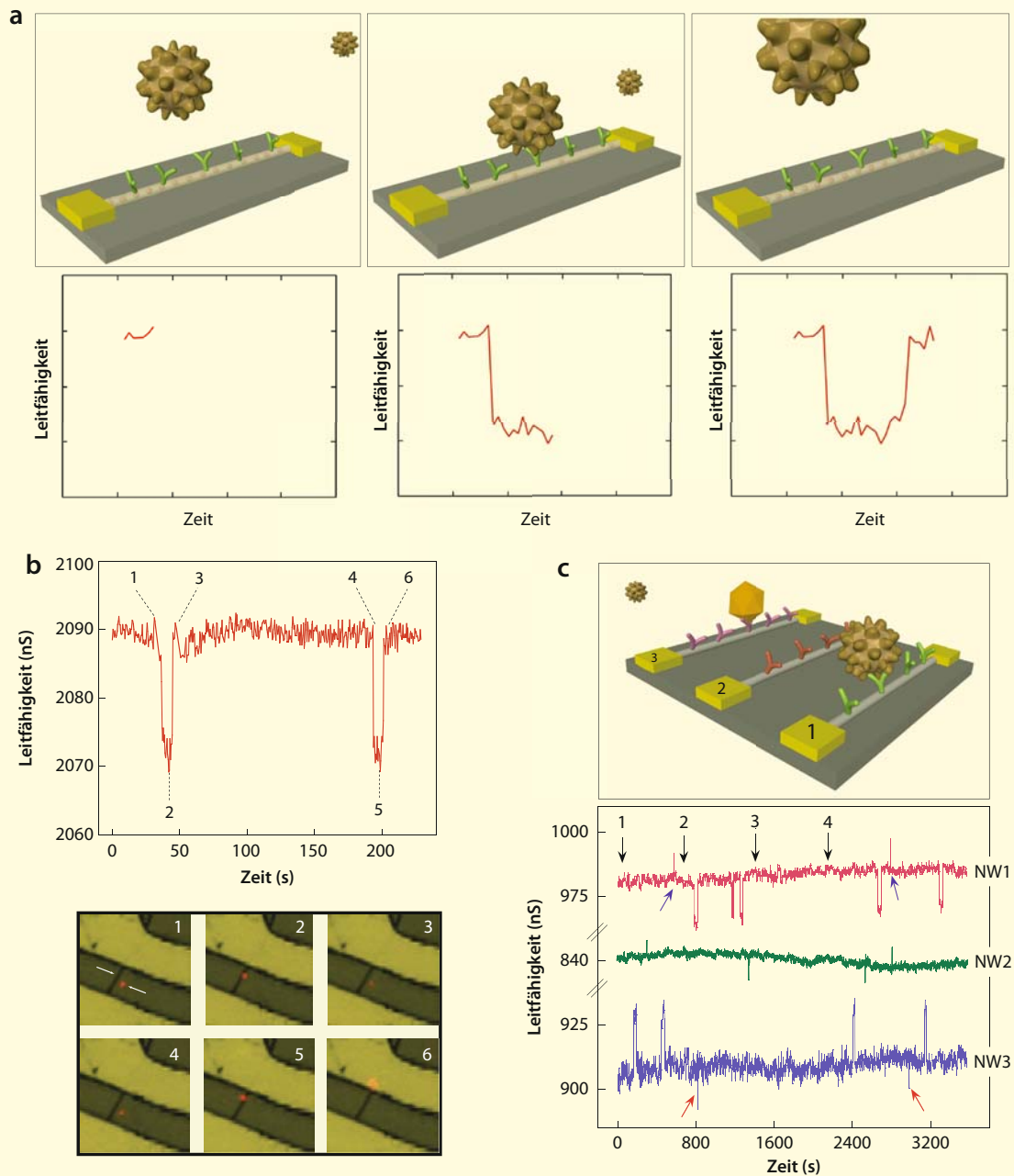
Aus Silizium-Halbleiternanokabeln lassen sich Biosensoren herstellen. Die Kabel können mit Antikörpern beschichtet werden, die spezifisch an ein Virus binden. Die Bindung verändert die Leitfähigkeit des Nanokabels. Bei einem Siliziumnanokabel vom P-Typ nimmt die Leitfähigkeit ab, wenn die Oberflächenladung auf dem Viruspartikel positiv ist. Umgekehrt nimmt sie zu, wenn die Viroberfläche negativ geladen ist. Durch diesen Ansatz lassen sich einzelne Viren nachweisen (Abb. 7.14). Außerdem ist es möglich, eine einzelsträngige DNA an dem Nanokabel zu befestigen. In diesem Fall wird die Leitfähigkeit durch die Bindung des komplementären Stranges verändert. Zu den zukünftigen Anwendungen gehören sowohl klinische Tests als auch die Verwendung als Sensoren für die Überwachung von Lebensmitteln, Wasser und der Atmosphäre, um die Gesundheit der Bevölkerung zu sichern.

Sensoren aus Nanokabeln vermögen einzelne Viren spezifisch nachzuweisen. Die Bindung eines Viruspartikels verändert die Leitfähigkeit des Kabels.

Ionenkanäle als Nanosensoren

Komplexer als Nanoröhrchen und Nanokabel sind **Ionenkanäle im Nanomaßstab**, die in Membranen eingebaut werden. Diese Kanäle lassen sich so regulieren, dass Ionen sie nur unter bestimmten Bedingungen passieren können. Der Ionenstrom erzeugt einen elektrischen Strom, der von einer entsprechenden Apparatur registriert, verstärkt und dargestellt wird.

Ionenkanäle lassen sich als Biosensoren einsetzen, indem man eine Bindungsstelle für ein Zielmolekül an den Kanaleingang heftet. Wie in Kapitel 23 beschrieben, werden häufig Antikörper als Bindungs-



7.14 Biosensoren aus Nanokabeln

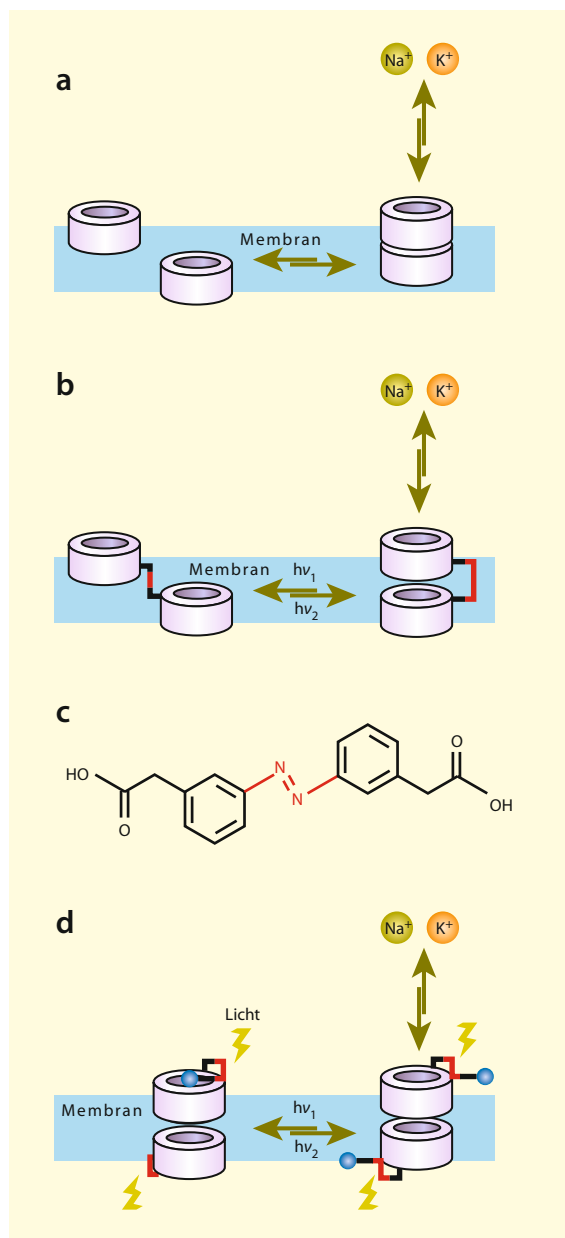
a Ein einzelnes Viruspartikel bindet an die Oberfläche eines SiNW-Nanokabels, das mit einem Antikörper beschichtet ist, und löst sich wieder. Für jeden Schritt ist die entsprechende Veränderung der Leitfähigkeit des Kabels gezeigt. **b** Leitfähigkeit und optische Daten nach Zugabe des Influenza-A-Virus. **c** Schema der Detektion vieler verschiedener Viren. Für alle drei Kanäle, die für verschiedene Viren spezifisch sind, wird die Veränderung der Leitfähigkeit über die Zeit gleichzeitig ermittelt und aufgetragen. NW1 reagiert auf das Influenza-A-Virus und NW3 auf das Adenovirus. Der NW2-Kanal wurde hier nicht eingesetzt. Die schwarzen Pfeile 1–4 zeigen die Zeitpunkte an, an denen das Adenovirus, das Influenza-A-Virus, Puffer und ein Gemisch der beiden Viren im Verhältnis 1:1 zugegeben wurden. Die roten und blauen Pfeile zeigen Veränderungen der Leitfähigkeit an, aufgrund einer Diffusion von Viruspartikeln vorbei am Nanokabel und ohne eine spezifische Bindung der Viren. Mit freundlicher Genehmigung von Charles M. Lieber, Harvard University, Cambridge, MA.

stellen verwendet (s. Abb. 23.16). Das einfachste Modell ist ein Kanal, der in Abwesenheit des Zielmoleküls offen ist, und der geschlossen ist, wenn das Molekül gebunden hat. Eine Abnahme des Ionenstromes signalisiert dann die Bindung des Zielmoleküls.

Zurzeit werden Ionenkanäle mit modifizierten biologischen Komponenten entwickelt. Der Ionenkanal selbst kann aus dem Peptidantibiotikum Gramicidin A bestehen (das durch das Bakterium *Bacillus brevis* synthetisiert wird). Dieses Molekül transportiert einwertige Kationen insbesondere Protonen und Natriumionen. Natürliches Gramicidin durchspannt die Hälfte einer normalen Biomembran. Wenn zwei Gramicidinmoleküle aufeinandertreffen und sich zusammenlagern, bildet sich für kurze Zeit ein membrandurchspannender Kanal (Abb. 7.15). Dauerhafte Kanäle entstehen, wenn zwei Gramicidinmoleküle kovalent miteinander verbunden sind. Bis zu 10^7 Ionen strömen pro Sekunde durch einen einzigen Kanal, wodurch ein elektrischer Strom im Picoamperebereich entsteht, der sich leicht messen lässt. Alternativ kann man auch die Veränderung des pH-Wertes messen, die sich aus der Wanderung der Protonen durch den Kanal ergibt. Möglich ist dies durch einen optischen Sensor und einen fluoreszierenden pH-Indikator.

Indem man einen geeigneten Liganden mit einem Ende des Gramicidinmoleküls verknüpft, sodass er aus der Membranoberfläche ragt, werden die Kanäle für bestimmte Stimuli empfindlich gemacht. Der Ligand bindet das Zielmolekül. Er kann ein Antigen oder ein kleines Molekül sein, das von einem Antikörper oder einen Proteinrezeptor erkannt wird. Auch kann ein einzelsträngiger DNA-Abschnitt gebunden werden, der die komplementäre Sequenz erkennt und bindet. Biosensoren lassen sich daher so konstruieren, dass sie auf viele verschiedene Biomoleküle reagieren.

Die Membran selbst kann eine Lipiddoppelschicht sein, auf der Basis von natürlichen Membranlipiden. Typische Phospholipide durchspannen nur die Hälfte der Membran (d.h. eine Einzelschicht), die beiden Einzelschichten verschieben sich daher gegeneinander. Die Membran lässt sich stabilisieren, indem Lipide eingebaut werden, die sich durch die gesamte Membran ziehen. Solche Lipide sind natürlicher Herkunft und in bestimmten Archaeobakterien zu finden, oder sie können künstlich hergestellt werden. Die Lipiddoppelschichten sind relativ instabil und müssen in der Praxis auf einem festen Träger zusammengesetzt werden. Die Herstellung einer stabilen und dauerhaften Membranstruktur erweist sich



7.15 Natürliche und modifizierte Gramicidin-Ionenkanäle

Gramicidin bildet einen membrandurchspannenden Kanal für Na^+ - und K^+ -Ionen. **a** Natürliche Gramicidinkanäle bilden sich, wenn sich zwei Gramicidinmoleküle in der Membran zusammenlagern. **b** Zwei Gramicidinmoleküle, die durch einen photosensitiven Linker verbunden sind (**c**). Die Lichtabsorption verändert die Konformation der N=N-Bindung (rot) des Linkers von *cis* nach *trans* und öffnet bzw. schließt den Kanal. **d** Die Kanäle werden durch Blockierungsgruppen geöffnet oder geschlossen (blaue Kugeln), die über photosensitive Linker mit jedem Gramicidinmonomer verbunden sind.

als schwierig und Ionenkanalsensoren befinden sich noch im Entwicklungsstadium.

Ionenkanalsensoren öffnen oder schließen sich als Reaktion auf die spezifische Bindung eines Moleküls. Sie lassen sich für den Nachweis von Zielmolekülen einsetzen.

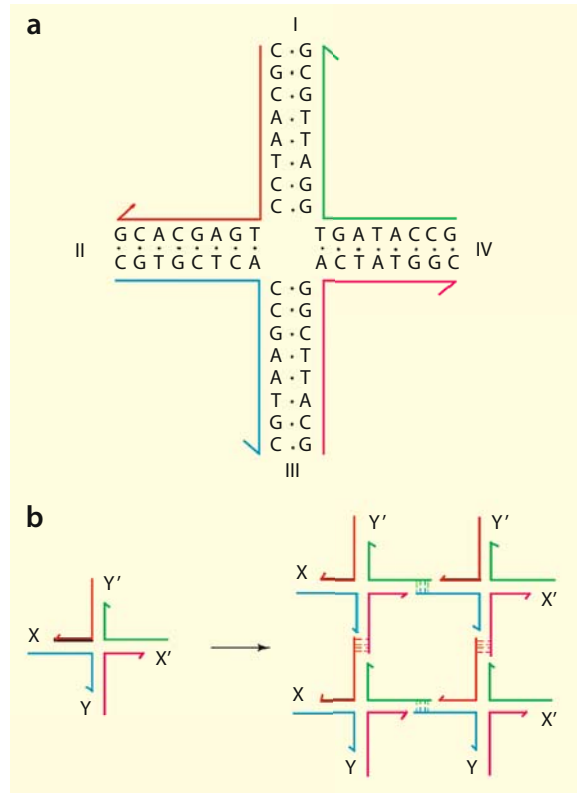
Gentechnische Veränderung von DNA im Nanomaßstab

In der klassischen Gentechnik wird die DNA-Sequenz gezielt verändert, um neue Kombinationen genetischer Information zu schaffen. Und auch wenn die DNA im größeren Maßstab umorganisiert wird, so bleibt sie doch eine lineare, doppelsträngige Helix mit Basenpaaren.

Die gentechnische Veränderung im Nanomaßstab hat die Herstellung von Strukturen zum Ziel, bei denen DNA als Strukturelement dient, und nicht die Veränderung der genetischen Information selbst. DNA ist in dieser Hinsicht sehr attraktiv, weil die Doppelhelix ein leicht handhabbares Modul darstellt. Außerdem lässt sich die natürliche Eigenschaft der Basenpaarung nutzen, um zwei DNA-Moleküle miteinander zu verbinden. Um dreidimensionale Strukturen zu schaffen, ist allerdings eine Verzweigung der DNA notwendig. Verzweigte Strukturen entstehen zwar auch in der Natur (z.B. bei der Holliday-Struktur, die sich während der Rekombination durch Crossing-over bildet), doch sind sie nicht stabil und dauerhaft.

Kreuzförmige DNA lässt sich herstellen, indem man vier sorgfältig konstruierte Einzelstränge mit unterschiedlichen Sequenzen mischt. Jeder Strang bildet über die Hälfte seiner Länge Basenpaare mit zwei anderen Strängen aus (Abb. 7.16). Besitzen die beiden ursprünglichen Stränge zwei kohäsive Enden, können die beiden Kreuze zu einer zweidimensionalen Matrix verbunden werden. Die Einzelstrangbrüche können, falls erwünscht, mit DNA-Ligase geschlossen werden. Die Prinzipien für die Herstellung der Verzweigung lassen sich auch auf die dritte Dimension übertragen, wodurch kubische DNA-Gitter entstehen.

Die DNA-Doppelhelix hat einen Durchmesser von etwa 2 nm und eine Windung umfasst etwa 3,5 nm. DNA lässt sich daher für die Herstellung von Gerüsten im Nanomaßstab einsetzen. Diese können

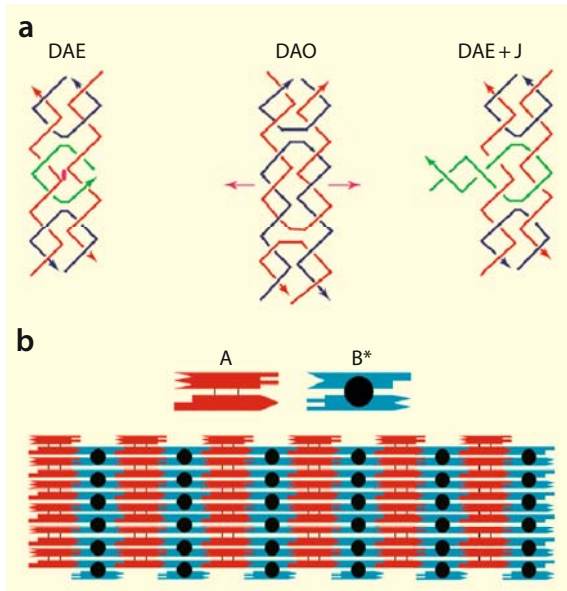


7.16 Verzweigte DNA aus vier einzelnen Strängen

a Ein verzweigtes DNA-Molekül mit vier Armen. Vier verschiedene Stränge (mit vier Farben dargestellt) werden miteinander kombiniert und es entsteht ein Molekül mit vier Armen (I, II, III und IV). Der Verzweigungspunkt dieses Moleküls ist stabil. **b** Die Bildung eines zweidimensionalen Gitters aus vierarmigen Molekülen mit kohäsiven Enden. X und Y sind kohäsive Enden und X' und Y' sind die ihnen entsprechenden Enden. Vier Monomere lagern sich parallel aneinander und es entsteht eine Gitterstruktur. DNA-Ligase schließt die Einzelstrangbrüche im Gitter. Aus Seeman (1999) DNA engineering and its application to nanotechnology. *Trends Biotechnol* 17: 437. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.

wiederum verwendet werden, um andere Bestandteile wie metallische Nanokabel oder Nanoschaltkreise zusammenzusetzen. Während die DNA über lange Strecken flexibel ist, ist sie im Nanomaßstab (bis zu ca. 50 nm) jedoch relativ starr.

Solche kreuzförmigen DNA-Moleküle (und die dreidimensionalen Produkte) haben den Nachteil, dass die Kreuzungen flexibel sind und keinen festen 90°-Winkel haben. Um hier Abhilfe zu schaffen, wurden steifere DNA-Moleküle mit doppeltem Crossing-over (DX-DNA-Moleküle) konstruiert. Grundlage



7.17 Starre DNA-Nanomodule

Aus Molekülen mit doppeltem Crossing-over (DX-Molekülen) lassen sich Netzwerke herstellen. **a** DAE und DAO sind zwei antiparallele DX-Isomere. DAE + J ist ein DAE-Molekül, bei dem eine zusätzliche Kreuzung den Einzelstrangbruch im grünen Strang von DAE ersetzt. **b** Zweidimensionales Netzwerk aus DX-Molekülen. Komplementäre kohäsive Enden sind durch komplementäre geometrische Formen dargestellt. A ist ein herkömmliches DX-Molekül, B* ist dagegen ein DX + J-Molekül mit einer vertikal herausragenden DNA-Haarnadelstruktur (schwarzer Punkt). Aus Seeman (1999) DNA engineering and its application to nanotechnology. *Trends Biotechnol* 17: 437. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.

sind hier zwei Isomere der antiparallelen DX-DNA, mit einer ungeraden (DAO) oder geraden (DAE) Zahl an halben Drehungen zwischen den Crossing-over-Stellen (Abb. 7.17). (Es gibt auch Moleküle mit doppeltem Crossing-over und parallelen Strängen, doch sie sind aus struktureller Sicht nicht so gut geeignet.) DAE und DAO-Einheiten lassen sich zu einem starren Netzwerk zusammenfügen, wenn geeignete kohäsive Enden vorhanden sind. Und es ist möglich, den zentralen, kurzen DNA-Strang der DAE-Struktur durch einen längeren Strang zu ersetzen, der aus dem Netzwerk herausragt (DAE + J). Dadurch können verzweigte Strukturen geschaffen werden.

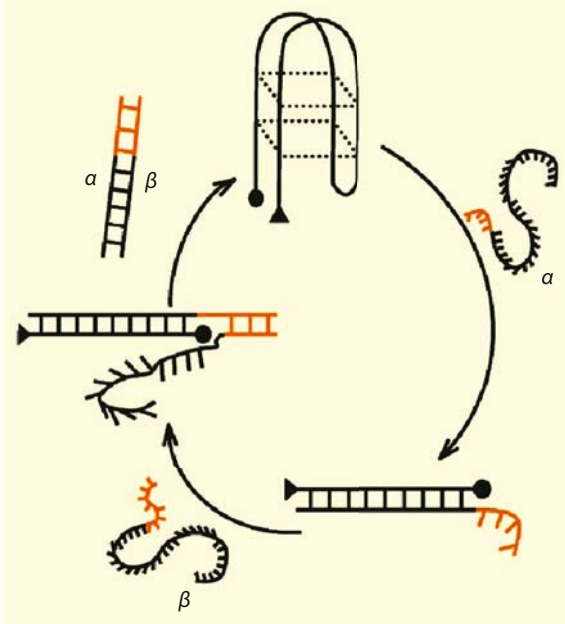
Welches Ziel verfolgt man mit der Herstellung von Netzwerken und dreidimensionalen Strukturen aus DNA? Der plausibelste Grund ist die mögliche Verwendung der DNA als Gerüst für den Zusammenbau

elektronischer Schaltkreise im Nanomaßstab. Bislang wurde nichtverzweigte DNA als Gerüst eingesetzt, um lineare Nanokabel aus Metall herzustellen. Verschiedene Metalle (Gold, Silber, Kupfer, Palladium, Platin) bildeten eine Hülle um die DNA, und die Durchmesser variierten von 3 bis 100 nm. Es sollte letztlich möglich sein, diese beiden Ansätze miteinander zu kombinieren und Schaltkreise aus metallumhüllten, dreidimensionalen DNA-Strukturen zu konstruieren.

DNA lässt sich auch als strukturgebendes Molekül betrachten. Es ist möglich, dreidimensionale Netzwerke aus DNA herzustellen, deren Sequenz so gezielt synthetisiert wurde, dass sich diese verzweigten Strukturen bilden. Solche DNA-Strukturen lassen sich als Gerüst verwenden, um metallische Kabel und Schaltkreise im Nanomaßstab herzustellen.

Mechanische DNA-Nanomaschinen

Eine weitere, eher futuristische Anwendung für dreidimensionale DNA-Strukturen ist die eines Gerüsts für mechanische Nanomaschinen. Notwendige Bestandteile einer solchen Maschine sind sich bewegende Teile. Etliche Prototypen solcher „DNA-Maschinen“ wurden entworfen oder konstruiert und verdeutlichen das Konzept. Alle beruhen auf reversiblen Veränderungen in der Konformation einer DNA-Struktur, die durch Veränderungen der Basenpaarung angetrieben wird. Verursacht werden können sie durch eine Modifikation der physikalischen Bedingungen (Hitze, Salz usw.) oder durch die Addition von einzelsträngigen DNA-Abschnitten (Abb. 7.18). Wird anfangs ssDNA eingesetzt, dann gibt man einen weiteren Einzelstrang zu, der komplementär zu dem ersten ist, sodass sich die Maschine wieder in die Ausgangsposition zurück bewegt. Das Ergebnis ist ein mechanischer Kreislauf, der sich im Grunde genommen einsetzen lässt, um eine bestimmte Aufgabe zu erfüllen. Die beiden ssDNA-Moleküle sind eine Art „Treibstoff“ und das Abfallprodukt ist eine doppelsträngige DNA, die aus den beiden ssDNA-Treibstoff-Elementen besteht. (Dieses Schema beruht nicht auf der Spaltung von kovalenten Bindungen. Es ist daher keine enzymatische Reaktion und unterscheidet sich von der Verwendung von DNA als Desoxyribozym, wie in Kapitel 5 beschrieben.)



7.18 Prototyp einer DNA-Maschine

Ein DNA-Nanomotor, entworfen von J. J. Li und W. Tan. Die aufeinanderfolgende Addition von komplementären DNA-Strängen (markiert mit α und β) verursachte eine Konformationsänderung. Der DNA-Nanomotor wechselt zwischen einer gefalteten Quadruplexstruktur und einer doppelsträngigen Struktur. Der Nanomotor dehnt sich aus und kontrahiert in einer wurmähnlichen Bewegung. Aus Ito und Fukuaki (2004) DNA as a nanomaterial. *J Mol Catalysis B: Enzymatic* 28: 155–166. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.

DNA wurde auch für den Einsatz als Gerüst für Nanomaschinen vorgeschlagen. Prototypen wurden bereits hergestellt, anhand derer man das Konzept überprüft hat.

Dieses geschieht durch das Erhitzen der gesamten DNA. Durch die Fortschritte in der Nanotechnologie ist es zukünftig vielleicht möglich, einzelne DNA-Moleküle gezielt dissoziieren zu lassen.

Dazu lagern sich Nanopartikel mit einer Größe von etwa 1,4 nm und bestehend aus weniger als 100 Goldatomen an die doppelsträngige DNA. Wird diese Struktur Radiowellen ausgesetzt (die durch ein wechselndes Magnetfeld entstehen), wirkt das Gold als eine Art Antenne. Es absorbiert Energie und heizt die DNA-Moleküle auf, mit denen es verbunden ist. Die Doppelhelix wird zu Einzelsträngen aufgeschmolzen. Die Hitze breitet sich über einen Bereich von etwa 10 nm aus, sodass die umgebenden Moleküle nicht beeinflusst werden. Sie kühlt innerhalb von weniger als 50 Picosekunden ab, sodass die DNA schnell zwischen einem einzelsträngigen und einem doppelsträngigen Zustand wechseln kann, wenn das Magnetfeld an- und ausgeschaltet wird. Das Verfahren lässt sich auf dsDNA anwenden, die aus zwei getrennten Einzelsträngen besteht (Abb. 7.19), oder auf Stamm-Schleife-Strukturen, die durch die Faltung eines einzelnen Stranges entstehen.

Praktische Anwendungen werden sich erst in der Zukunft ergeben. Da Radiowellen jedoch lebendes Gewebe sehr effizient durchdringen, könnte es möglich sein, das Verhalten einzelner DNA-Moleküle von außen zu steuern. Metallantennen unterschiedlicher Materialien oder Größen könnten eingesetzt werden, um verschiedene DNA-Moleküle auf Radiowellen unterschiedlicher Frequenzen einzustellen.

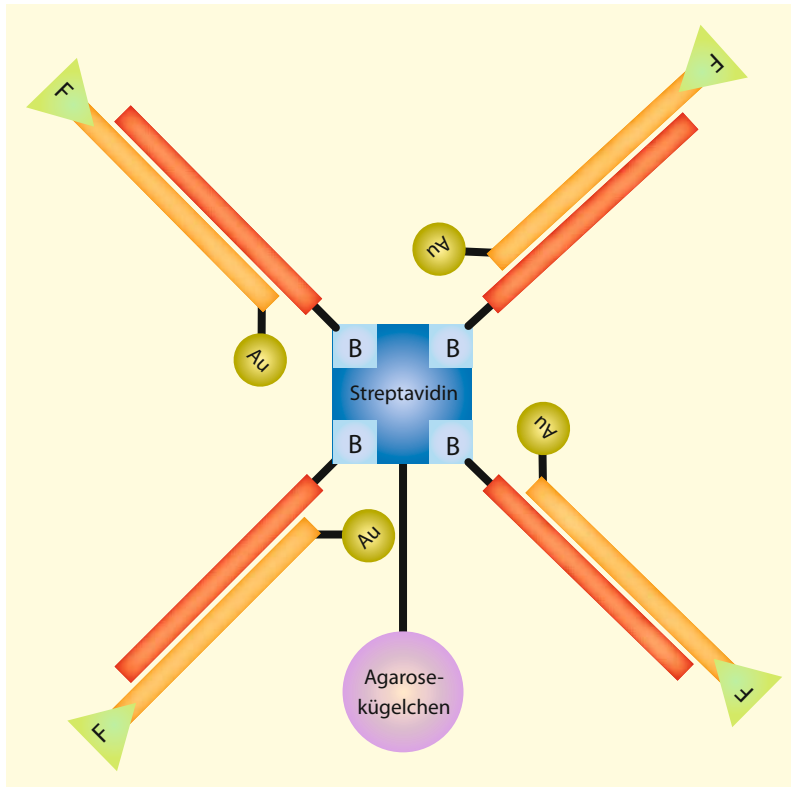
Durch die Anlagerung von metallischen Antennen lässt sich DNA mithilfe von Radiowellen schmelzen. Es könnte zukünftig möglich sein, das Verhalten von DNA von außen zu steuern.

Kontrollierte Denaturierung von DNA durch Nanopartikel aus Gold

Die DNA-Hybridisierung wird sowohl im Labor als auch in der klinischen Diagnose häufig für den Nachweis von Zielsequenzen eingesetzt. Bevor eine Hybridisierung stattfinden kann, muss die DNA-Doppelhelix zu Einzelsträngen denaturiert werden.

Kontrollierte Veränderung der Proteinstruktur durch DNA

Allosterische Proteine verändern ihre Struktur als Reaktion auf die Bindung von Signalmolekülen (allosterischen Effektoren) an einer spezifischen Stelle im Molekül. Wesentlich bei der allosterischen Kontrolle ist, dass die Veränderung der Struktur im



7.19 Steuerung der DNA-Denaturierung durch Nanopartikel aus Gold

An das Ende eines DNA-Stranges sind Nanopartikel aus Gold (Au) gebunden, das andere Ende wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff (F) verknüpft. Der komplementäre Strang trägt an einem Ende ein Biotin-Tag (B). Das Biotin wird durch Streptavidin gebunden und koppelt den DNA-Strang dadurch an ein Agarosekügelchen. Absorbiert das Gold Energie, dann schmelzen die beiden Stränge. Der Strang mit dem Fluoreszenzfarbstoff wird in den Überstand freigesetzt und kann anhand der Fluoreszenz nachgewiesen werden.

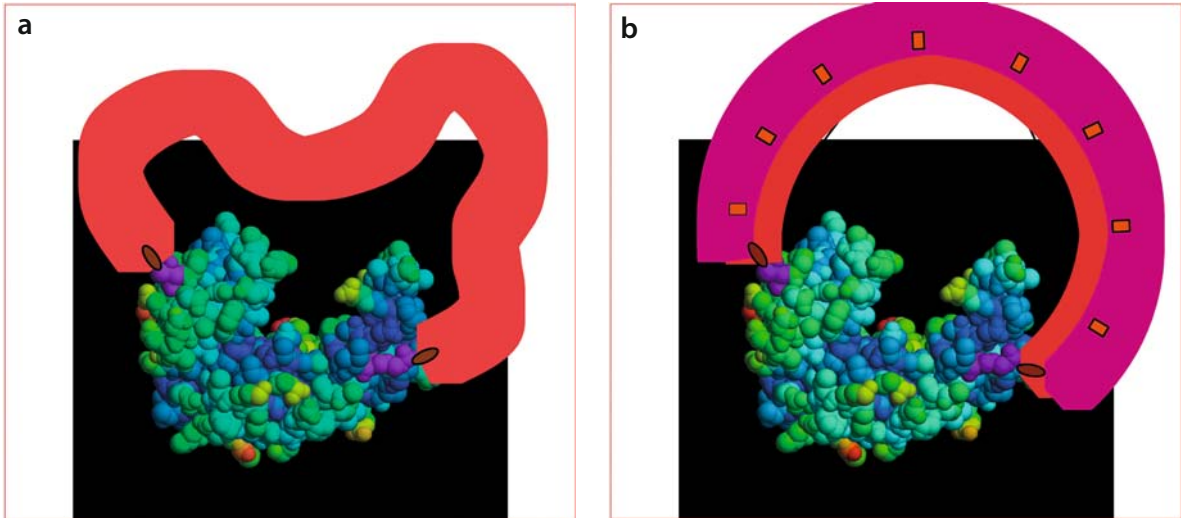
Protein übertragen wird und sich an einer anderen Stelle des Moleküls auswirkt. Bei allosterischen Enzymen verändert die Bindung eines allosterischen Effektors an einer entfernt liegenden Stelle die Konformation des aktiven Zentrums und kann dessen Affinität für das Substrat beeinflussen. Auf diese Weise werden einige Enzyme als Reaktion auf ein Signalmolekül aktiviert oder inaktiviert. So wird die Phosphofructokinase z.B. durch hohe Konzentrationen von AMP aktiviert, da AMP einen Mangel an Energie signalisiert. Durch die Aktivierung erhöht sich der Fluss von Metaboliten durch die Glykolyse. In ähnlicher Weise verändern viele DNA-bindende Proteine wie Repressoren und Aktivatoren ihre Gestalt, nachdem sie kleine Signalmoleküle gebunden haben.

Es ist möglich, die Struktur eines Proteins auch künstlich durch die Anwendung einer mechanischen Kraft zu verändern. Zeigen konnte man dies durch die Verknüpfung eines einzelsträngigen, 60 Basen langen DNA-Abschnittes mit den beiden Enden eines Proteins. Für diesen Ansatz waren chemische „Handgriffe“ im Zielprotein erforderlich. Diese wurden in das Zielprotein eingesetzt, indem man die Amino-

säuren an geeigneten Stellen durch Cystein ersetzte. An diese reaktiven SH-Gruppen wurde anschließend die DNA geknüpft.

Doppelhelikale DNA ist viel stabiler als ssDNA. Die Addition bzw. Bindung des komplementären Stranges, bei der Bildung der Doppelhelix, führt zu einer Spannung. Im Labor von Giovanni Zocchi an der UCLA führte man diesen Ansatz mit einem maltosebindenden Protein und einem Enzym, der Guanylat-Kinase, durch. Wurde das maltosebindende Protein gestreckt, dann weitete sich die Bindungsstelle für die Maltose über das optimale Maß hinaus und die Affinität für den Zucker sank. Bei der Guanylat-Kinase (Abb. 7.20) verringerte die Spannung die Enzymaktivität, da die Affinität für das Substrat reduziert wurde. In diesem Fall ließ sich das Enzym durch die Zugabe einer DNase aktivieren, die die DNA spaltete.

Möglicherweise ergeben sich zukünftig Anwendungen für dieses Verfahren. So sind Biosensoren vorstellbar, die DNA-Sequenzen nachweisen können. Außerdem könnte es möglich sein, Enzyme oder andere Proteine von außen zu kontrollieren, indem man eine geeignete ssDNA (oder RNA) zugibt.



7.20 Kontrolle der Proteinstruktur durch DNA

Ein chimäres Molekül aus Protein (Guanylat-Kinase aus *Mycobacterium tuberculosis*; PDB-Struktur 1S4Q) und ssDNA. Die violetten Verknüpfungspunkte für die molekulare Feder entsprechen den Mutationen Thr75→Cys und Arg171→Cys. **a** Nichtgestreckt – ein einzelner DNA-Strang wird mit dem Protein verknüpft. **b** Das Protein wird durch die Zugabe des komplementären DNA-Stranges (pink) gestreckt. Mit freundlicher Genehmigung von Giovanni Zocchi.

Die Gestalt eines Proteins lässt sich künstlich beeinflussen, indem man Kraft aufwendet. Dies zeigt die Verknüpfung von DNA-Strängen mit einem Protein. Bildet einzelsträngige DNA mit dem komplementären Strang Basenpaarungen aus, dann entsteht eine Spannung und das Protein streckt sich.

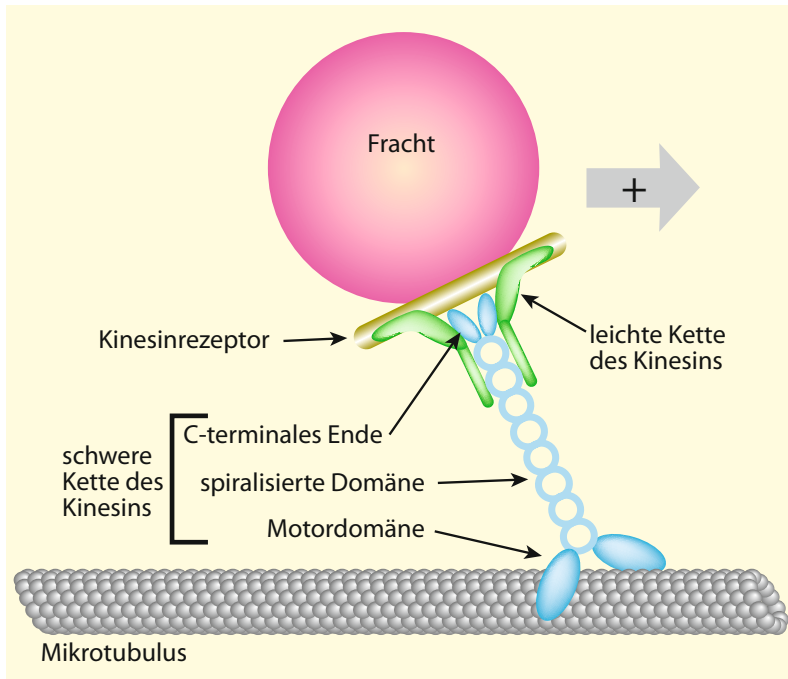
Biomolekulare Motoren

Eines der Hauptziele der Nanotechnologie ist die Entwicklung von Maschinen im molekularen Maßstab, die die programmierte Synthese (oder Umlagerungen) einzelner Moleküle (oder sogar Atome) oder andere Aufgaben im Nanomaßstab durchführen können. Die Bezeichnung (Nano)**Assembler** bezieht sich auf eine Maschine, die im Nanomaßstab Strukturen herstellen kann, Molekül für Molekül, Atom für Atom. Und der Begriff (Nano)**Replikator** bezeichnet eine Nanomaschine, die Kopien ihrer selbst herstellen kann, wenn Energie und Ausgangsmaterialien bereitgestellt werden. Das klingt in bemerkenswerter Weise nach einer Zelle. Und tatsächlich können die Organellen in lebenden Zellen als Nanomaschinen

angesehen werden, die für die Nanotechnologie sowohl Ideen als auch einzelne Komponenten geliefert haben.

Um zu funktionieren, brauchen Nanomaschinen Energie, die von molekularen Motoren geliefert wird. Zurzeit sind solche Geräte in der Entwicklung. Für diesen Zweck wurden biologische Strukturen vorgeschlagen, wie die ATP-Synthase, der Flagellenmotor von Bakterienzellen, verschiedene Enzyme, die sich entlang von DNA und RNA bewegen, und Motorproteine eukaryotischer Zellen. Einige dieser Systeme werden momentan auf ihre Eignung überprüft und man hofft, mit ihrer Hilfe Nanomotoren herstellen zu können, die sich mit Nanomaschinen koppeln lassen. Die Nanomotoren sollen direkt als bewegliche Teile der Maschinen verbaut werden und/oder die Energie für deren Betrieb bereitstellen.

Die ATP-Synthase ist ein rotierender Motor, dessen natürliche Funktion die ATP-Synthese ist. Das Molekül ist in die mitochondriale Membran eingebettet und nutzt die Energie der protonenmotorischen Kraft. Das Enzym rotiert in drei Schritten einmal um die eigene Achse, wobei bei jedem Schritt ein Molekül ATP entsteht. Für eine Verwendung in der Nanotechnologie würde die F1-Untereinheit aus der Membran gelöst und das Enzym würde in entgegengesetzter Richtung arbeiten (d.h. ATP würde



7.21 Kinesin als Linearschrittmotor auf einem Mikrotubulus

Kinesin besteht aus leichten und schweren Ketten. Die leichten Ketten binden an Kinesinrezeptoren auf zu transportierenden Vesikeln. Die schweren Ketten enthalten Motordomänen, die ATP als Energiequelle benötigen, um Kinesin samt Fracht entlang eines Mikrotubulus zu transportieren.

Exkurs 7.3

Vom „nur Mikro-“ zum echten Nanomaßstab: Das „Labor in der Zelle“

Der Begriff „*microfluidics*“ (gelegentlich auch als „Labor auf einem Chip“ bezeichnet) steht für die Manipulation von flüssigen Proben im Mikrometermaßstab. Heutzutage stehen *microfluidic*-Geräte zur Verfügung, sie werden eingesetzt, um große Probenmengen mit geringen Volumina parallel zu bearbeiten. Zu den Anwendungen gehört die DNA- oder Proteinanalyse von Blutproben. Die erforderlichen Volumina bewegen sich in der Regel im Mikroliterbereich, doch manche *microfluidic*-Geräte verarbeiten auch Nanoliter. Man könnte dieses Verfahren nun der Nanotechnologie zuschreiben, doch es ist zu beachten, dass Volumen die dritte Potenz eines Längenmaßes ist. Ein Würfel mit der Kantenlänge von

$1\text{ }\mu\text{m}$ (10^{-6} m) hat daher ein Volumen von 10^{-18} m^3 oder 10^{-15} l (ein Femtoliter). Ein Nanoliter (10^{-9} l) ist das Volumen eines Würfels mit einer Kantenlänge von $100\text{ }\mu\text{m}$. Der Umgang mit Nanolitern ist daher keine Nanotechnologie!

Ausblicke in die Zukunft reduzieren das Volumen von flüssigen Proben auf einen echten Nanomaßstab – das „Labor in der Zelle“. Vorstellbar ist ein Mikrochip, auf dem mithilfe von einzelnen modifizierten Zellen Analysen durchgeführt werden können. Diese Ideen befinden sich noch in der Entwurfsphase, doch ihre Umsetzung könnte in naher Zukunft gelingen, wenn die Entwicklung der Nanotechnologie ihr rasantes Tempo beibehält.

zugegeben und die Rotation liefere, aus biologischer Sicht, rückwärts ab).

Kinesin und Dynein sind Motorproteine, die ATP als Energiequelle verwenden, um sich entlang der Mikrotubuli eukaryotischer Zellen zu bewegen. Es handelt sich daher um Linearschrittmotoren (Abb. 7.21). Ihre natürliche Funktion ist der Materialtransport.

Kinesin bewegt Frachten vom Zentrum zur Peripherie der Zelle, Dynein dagegen von der Peripherie zum Zentrum. Kinesin unternimmt dabei Schritte von 8 nm und vermag etwa 100 Schritte pro Sekunde auszuführen (das sind etwa 3 mm in der Stunde!). Jeder Schritt verbraucht ein ATP-Molekül. Die Mikrotubuli, die sie als eine Art Gleis verwenden, bestehen

aus Proteinzylindern mit einem äußeren Durchmesser von 30 nm.

Proteine, die chemische und mechanische Energie ineinander umwandeln, werden auf einen Einsatz als molekulare Motoren für den Antrieb zukünftiger Nanomaschinen getestet.

► Weiterführende Literatur

- Bogunia-Kubik K, Sugisaka M (2002) From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. *BioSystems* 65: 123–138
- Bianco A, Kostarelos K, Prato M (2005) Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol* 9: 674–679
- Choi B, Zocchi G, Wu Y, Chan S, Jeanne Perry L (2005) Allosteric control through mechanical tension. *Phys Rev Lett* 95: 78–102
- Hamad-Schifferli K, Schwartz JJ, Santos AT, Zhang S, Jacobson JM (2002) Remote electronic control of DNA hybridization through inductive coupling to an attached metal nanocrystal antenna. *Nature* 415: 152–155
- Hartmann U (2006) *Nanotechnologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Hess H, Bachand GD, Vogel V (2004) Powering nanodevices with biomolecular motors. *Chem Eur J* 10: 2110–2116
- Ilic B, Yang Y, Craighead HG (2004) Virus detection using nanoelectromechanical devices. *Appl Phys Lett* 85: 27
- Li JJ, Tan W (2002) A single DNA molecule nanomotor. *Nano Lett* 2: 315–318
- Liu D, Park SH, Reif JH, LaBean TH (2004) DNA nanotubes self-assembled from triple-crossover tiles as templates for conductive nanowires. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 717–722
- Matsunaga T, Okamura Y (2003) Genes and proteins involved in bacterial magnetic particle formation. *Trends Microbiol* 11: 563–541
- Niemeyer CM, Mirkin CA (2004) Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives. Wiley-VCH
- Papazoglou ES, Parthasarathy A (2007) BioNanotechnology (Synthesis Lectures on Biomedical Engineering). Morgan and Claypool Publishers, San Rafael, CA
- Patolsky F, Zheng G, Hayden O, Lakadamyali M, Zhuang X, Lieber CM (2004) Electrical detection of single viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14017–14022
- Riegler J, Nann T (2004) Application of luminescent nanocrystals as labels for biological molecules. *Anal Bioanal Chem* 379: 913–919
- Zhang S (2003) Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol* 21: 1171–1178

Genomik und Genexpression

Einführung

Techniken zur Genkartierung

Für physikalische Karten werden Sequenzdaten verwendet

Radiation-hybrid-mapping und cytogenetische Chromosomenkarten

Sequenzierung ganzer Genome

Der Wettlauf um das menschliche Genom

Das menschliche Genom weist noch Lücken auf

Analyse des menschlichen Genoms

Nichtcodierende Bestandteile des menschlichen Genoms

Bioinformatik und Computeranalyse

Medizin und Genomik

In der DNA häufen sich mit der Zeit Mutationen an

Genetische Evolution

Von der Pharmakologie zur Pharmakogenetik

Genexpression und Microarrays

Herstellung von DNA-Microarrays

- cDNA-Microarrays

- Oligonucleotid-Microarrays

Hybridisierung auf DNA-Microarrays

Ermitteln der Genexpression mit genomweiten Tiling Arrays

Ermitteln der Expression einzelner Gene

Weiterführende Literatur

Einführung

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms war eine gewaltige Aufgabe und geht auf eine Initiative des Energieministeriums der Vereinigten Staaten (US Department of Energy) im Jahr 1986 zurück. Man hatte sich zum Ziel gesetzt, von jedem menschlichen Chromosom eine qualitativ hochwertige Referenz der Sequenzinformationen zu erhalten. Unterstützung erhielt die Initiative, als sich 1990 die National Institutes of Health (NIH) dem Projekt anschlossen. Im Laufe der 1990er-Jahre kamen viele weitere Mitarbeiter aus der ganzen Welt hinzu. Im Juni 2000 wurde schließlich der erste Entwurf des menschlichen Genoms vorgelegt. Danach wurde die Sequenz noch einmal überarbeitet, bis im April 2003 die endgültige, qualitativ hochwertige Sequenz veröffentlicht wurde. Im Rahmen des Humangenomprojekts wurden auch die vollständigen Genome von Modellorganismen wie Maus und *Drosophila* sequenziert. Außerdem hat man die Berechnungsmethoden für die Analyse von Sequenzdaten verfeinert, die Funktion von Genen bei verschiedenen Organismen miteinander verglichen und die Variabilität beim Menschen analysiert.

Die Verfügbarkeit von Genomsequenzen hat viele Gebiete der Biologie revolutioniert, vom Erstellen von Evolutionsstammbäumen bis zur Entwicklung und Testung neuer Arzneimittel. Die Genomik hat sich auch auf die Erforschung der Genexpression ausgewirkt, denn sie lieferte Methoden, mit denen man Tausende von Genen gleichzeitig analysieren kann, statt sie jeweils einzeln untersuchen zu müssen.

Techniken zur Genkartierung

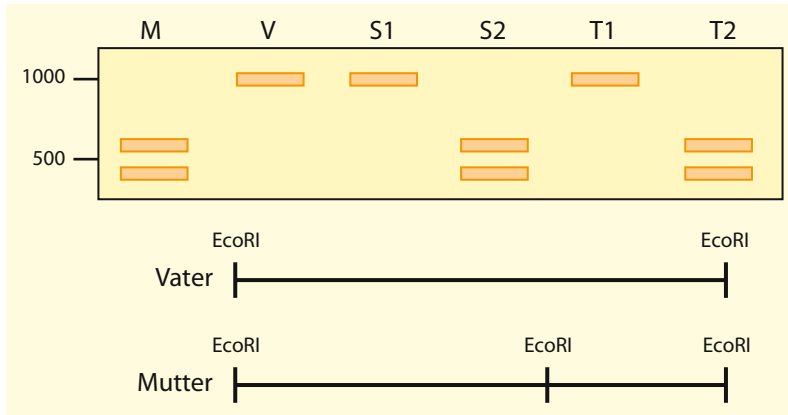
Zum Sequenzieren von Genomen erstellt man zunächst Bibliotheken genomischer DNA-Abschnitte und sequenziert dann jeweils die Abschnitte. Daraus muss man schließlich die endgültige Sequenz zusammensetzen. Um die Sequenzdaten innerhalb eines Entwurfs des Genoms zu strukturieren, erstellte das Humangenomprojekt zunächst ein Arbeitsexemplar einer Genomkarte. **Genomkarten** oder **Genkarten** liefern verschiedene Orientierungspunkte, an denen man sich bei der Zusammenstellung der Sequenzdaten orientieren kann. Man unterscheidet zwei Kategorien von Genkarten, **genetische Karten** und **physikalische Karten**. Genetische Genkarten beruhen auf der

relativen Anordnung genetischer Marker; die tatsächliche Distanz zwischen den Markern lässt sich jedoch kaum bestimmen. Physikalische Karten sind in dieser Hinsicht präziser und geben die genaue Entfernung zwischen zwei Markern in Basenpaaren an.

Herkömmliche Genkarten werden anhand der Rekombinationshäufigkeit von Genen, also der **Genkopplung**, erstellt. In Eukaryotenzellen erfolgt während der Meiose durch Crossing-over eine Rekombination zwischen homologen Chromosomenpaaren. Je geringer der Abstand zweier Gene auf demselben Chromosom ist, desto seltener werden sie durch Rekombination getrennt. Liegen die beiden Gene jedoch weit auseinander, kommt es relativ häufig zu einer Rekombination. Zur Erstellung der ersten Genkarten wurde die Rekombinationshäufigkeit zwischen Genen festgestellt (sogenannte Kopplungskarten).

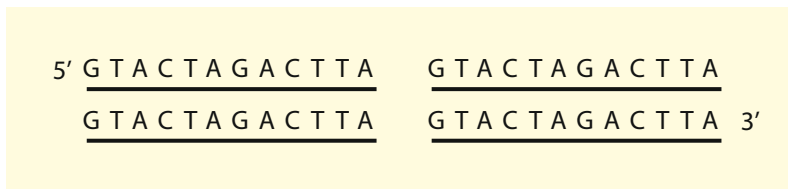
Die Orientierungspunkte, auf denen Genkarten beruhen, bezeichnet man als **genetische Marker**. Es können viele verschiedene Formen von Markern verwendet werden. Die Reihenfolge dieser Marker wird dadurch bestimmt, wie oft zwei Marker bei Nachkommen auftreten. Die nützlichsten Marker sind Gene. In großen Genomen gibt es jedoch häufig zu wenige echte Gene, die zudem zu weit auseinander liegen, um eine aussagekräftige Karte erstellen zu können. Bei Organismen wie *Drosophila* sind Gene, die für bestimmte Merkmale codieren, hervorragende Marker, da man die Tiere kontrolliert und gezielt verpaaren kann. Nach Verpaarung vieler Fliegen kann man die Zahl der Fliegen mit beiden Markern ermitteln. Je häufiger die Marker bei den Nachkommen gemeinsam auftreten, desto näher beieinander liegen sie im Genom. Beim Menschen sind derartige gezielte Paarungsexperimente ethisch nicht vertretbar. Außerdem enthält das menschliche Genom lediglich einen geringen Anteil codierender DNA. Dadurch erhält man bei Verwendung echter Gene nicht genügend Orientierungspunkte auf der Karte. Anhand einer spärlich bestückten Karte lässt sich die Reihenfolge der durch das Sequenzierungsprojekt gewonnenen Sequenzen nur schwer feststellen. Deshalb verwendet man für Genkarten auch noch andere Marker, beispielsweise physikalische.

Als Beispiel für einen physikalischen Marker sind RFLPs – Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (s. Kap. 3) – zu nennen. RFLPs werden häufig verwendet, weil sie leicht zu identifizieren sind. Bei kleinen Genomen wie dem der Hefe lässt sich die Rekombinationshäufigkeit zweier RFLPs recht einfach überprüfen. Diploide Hefezellen machen eine Meiose durch und bilden vier haploide Zellen in einer als



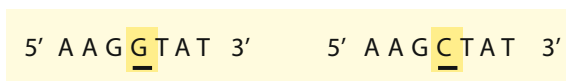
8.1 RFLPs von Familienmitgliedern

Die Mutter (M) und der Vater (V) dieser Familie haben eine unterschiedliche DNA-Sequenz. Bei der Mutter findet sich eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI*. Die Kinder (S1, S2, T1 und T2) haben das eine oder andere Fragment von ihren Eltern geerbt.



8.2 Tandem-repeat aus zwölf Basenpaaren

Dieses Individuum besitzt nur vier Wiederholungen dieser zwölf Basenpaare langen Sequenz. Bei anderen Menschen können es auch mehr oder weniger sein.



8.3 SNPs

Der gleiche DNA-Abschnitt von zwei verschiedenen Individuen unterscheidet sich in einem einzigen Nucleotid, es handelt sich also um einen SNP. Solche Substitutionen finden sich beim Vergleich der DNA-Sequenzen von Menschen häufig.

Tetrade bezeichneten Gruppe. Jede dieser haploiden Zellen kann man isolieren, daraus viele identische Klone kultivieren und diese einzeln untersuchen. Somit lässt sich jeder RFLP-Marker problemlos von einer Generation zur nächsten verfolgen. Beim Menschen ist es weitaus schwieriger, solche Marker zu verfolgen. Durch Studien an Gruppen nahe verwandter Menschen, wie Großfamilien oder kleinen Kulturen wie den Amischen, konnte man ebenfalls einige RFLPs auf diese Weise verfolgen (Abb. 8.1).

Als weitere Marker zur Erstellung von Genkarten dienen **VNTRs (variable number tandem repeats)** (Abb. 8.2), auch als Minisatelliten bezeichnet. Diese Sequenzanomalien kommen von Natur aus im Genom vor und bestehen aus Tandem-repeats (Tandemwiederholungen) von neun bis 80 Basenpaaren Länge. Die Zahl der Wiederholungen ist von Person

zu Person unterschiedlich. Daher können sie auf einer Genkarte als spezifische Marker dienen. Außerdem kann man sie zur Identifizierung von Personen in der forensischen Medizin oder bei Vaterschaftstests verwenden. Einige der Repeats befinden sich an vielen Stellen im gesamten Genom und sind für das Erstellen von Genkarten nicht geeignet. Andere dieser wiederholten Sequenzen kommen nur an einer einzigen Stelle vor.

Ein dritter Markertyp ist der **Mikrosatelliten-Polymorphismus**. Dabei handelt es sich ebenfalls um ein Tandem-repeat. Anders als bei den VNTRs sind die Wiederholungen bei den Mikrosatelliten-Polymorphismen nur zwei bis fünf Basenpaare lang und bestehen in der Regel aus Cytosin und Adenosin.

Ein vierter, zur Erstellung von Genkarten verwendeter genetischer Markertyp sind die sogenannten **SNPs (ausgesprochen wie „snips“)** oder **single nucleotide polymorphisms** (Abb. 8.3). Hier sind einzelne Nucleotide substituiert, was sich nicht auf die Länge der DNA-Sequenz auswirkt. Solche Substitutionen finden sich innerhalb von Genen, in regulatorischen Regionen oder in nichtcodierender DNA. Befinden sich die SNPs in den codierenden Abschnitten von Genen, kann sich dadurch die Aminosäuresequenz des codierten Proteins ändern. Das wiederum kann Folgen für die Proteinfunktion haben. Ist ein SNP mit einer Erbkrankheit korreliert, so kann man diese

Krankheit durch Identifikation des SNP noch vor Auftreten der Symptome diagnostizieren. Fällt ein SNP mit einer Restriktionsschnittstelle zusammen, so deckt er sich mit einem RFLP.

Indem man die Reihenfolge verschiedener Marker feststellt, können genetische Karten erstellt werden. Als Marker dienen beispielsweise RFLPs, SNPs, VNTRs und Mikrosatelliten-Polymorphismen.

Für physikalische Karten werden Sequenzdaten verwendet

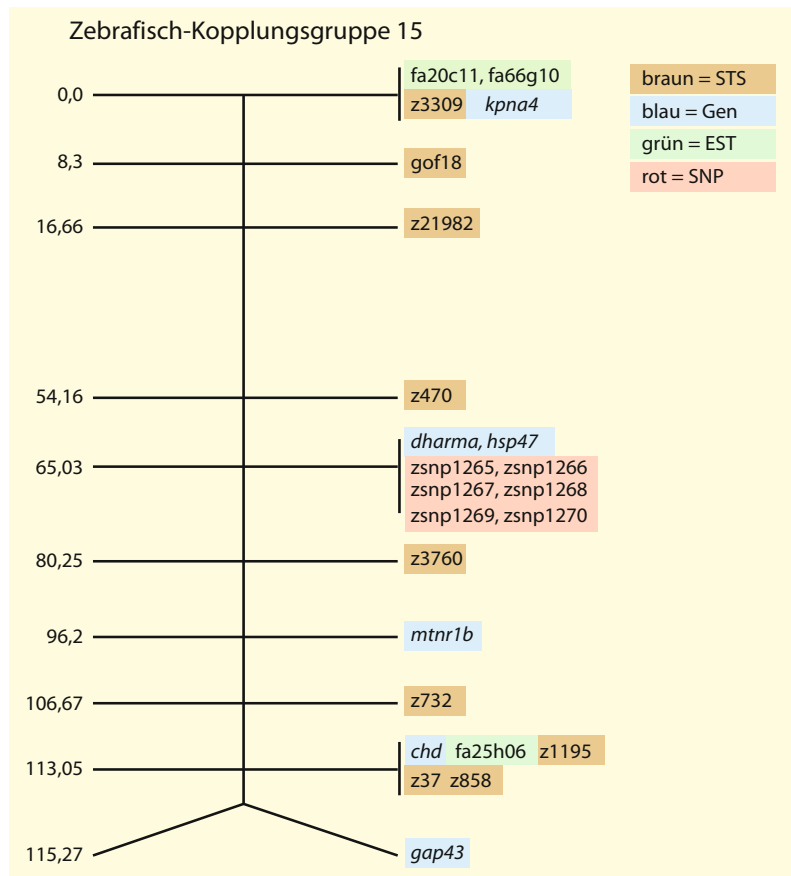
Genetische Marker wie SNPs, VNTRs, RFLPs und Mikrosatelliten sind zur Sequenzierung zwar sehr hilfreich, für große Genome wie das des Menschen liefern

sie jedoch nicht genügend Marker. Deshalb benötigte man zur Erstellung von Genkarten weitere Marker wie die **sequence tagged sites (STSs)**; sequenzmarkierte Stellen) (Abb. 8.4). Dabei handelt es sich um einfache kurze Sequenzen von 100 bis 500 Basenpaaren Länge; sie kommen nur einmal vor und können mittels PCR festgestellt werden. Ein spezieller STS-Typ sind die **expressed sequence tags (ESTs)**; ihren Namen erhielten diese exprimierten DNA-Sequenzabschnitte, weil man sie in einer cDNA-Bibliothek identifiziert hat. Das bedeutet, die ESTs werden in mRNA exprimiert. Diese kurzen Sequenzabschnitte sind lediglich Bestandteile größerer Gene, weshalb man in einem einzelnen Gen viele verschiedene ESTs finden kann.

Das Kartieren physikalischer Marker ähnelt der Kopplungsanalyse von Genen: Je näher diese Marker beieinander liegen, umso wahrscheinlicher ist es, dass sie zusammen bleiben. Allerdings wird die Kopplung physikalischer Marker durch den Verdau mit Restriktionsenzymen bestimmt (Abb. 8.5). Komplette Genome oder auch einzelne große Klone aus

8.4 STS- und EST-Marker auf einer Kopplungskarte des Zebrafisches

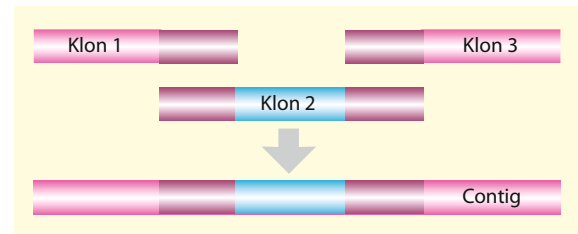
Diese Genkarte des Zebrafisches zeigt die relativen Positionen verschiedener Marker, darunter auch identifizierte STSs und ESTs, deren relative Position zueinander bestimmt wurde. Zusätzlich eingezeichnet sind die Positionen echter Gene und SNPs im Verhältnis zu den übrigen Markern. Die Kopplung wurde anhand der Rekombinationshäufigkeit in der Meiose festgestellt und ist in Centimorgan (cM) angegeben. Die Informationen für diese Darstellung der GAT-Kopplungsgruppe 15 des Zebrafisches stammen vom Zebrafish Information Network (ZFIN) des Zebrafish International Resource Center, University of Oregon, Eugene, <http://zfin.org/>.



einer Bibliothek werden von vielen verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Jedes dieser Enzyme schneidet die DNA in unterschiedlich große Fragmente, die man auf mehrere verschiedene STS- oder EST-Marker überprüfen kann. Liegen zwei Marker nahe beieinander, so findet man sie häufig auf dem gleichen Restriktionsfragment, weit voneinander entfernte Marker sind hingegen auf verschiedenen Fragmenten zu finden. Da die Größe der Fragmente festgelegt ist, lässt sich daraus die ungefähre Distanz zwischen zwei Markern abschätzen.

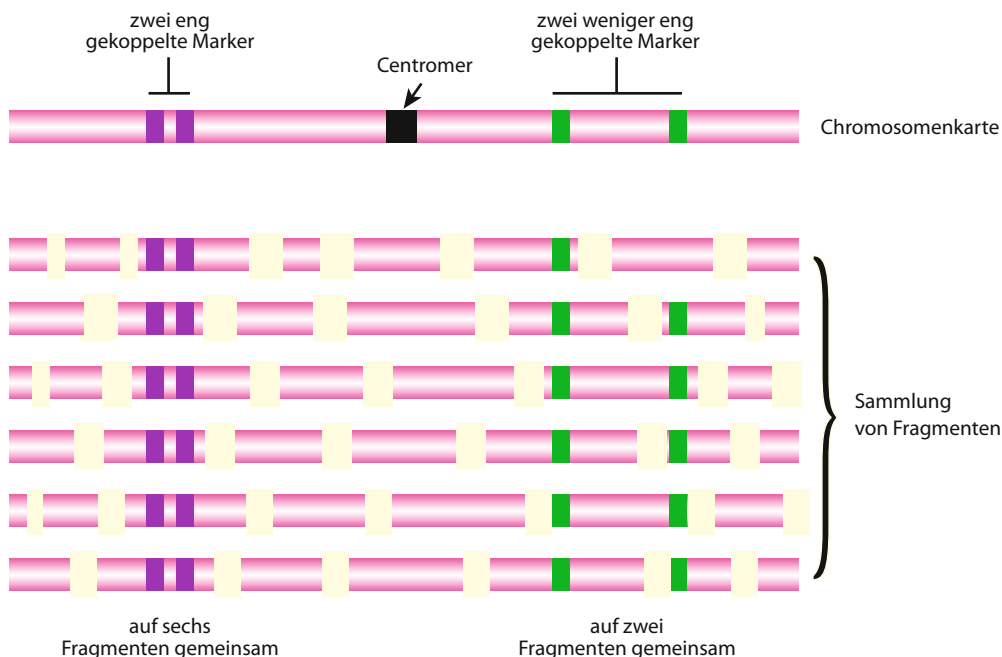
Vergleicht man viele verschiedene Klone einer DNA-Bibliothek eines Genoms, werden diese häufig überlappen. Die Überlappungsregion ist in der Sequenz identisch und weist daher auch die gleichen Restriktionsschnittstellen, STS-Marker und ESTs auf. **Contig-Karten** vergleichen die überlappenden Regionen und ordnen die Klone so zu einem linearen Ab-

schnitt, den man als **Contig** bezeichnet (Abb. 8.6). Je mehr Klone analysiert werden, desto länger werden die Contigs, und man erhält große Chromosomenabschnitte.



8.6 Erstellen von Contig-Karten

Kleine Klone haben überlappende Regionen. Anhand dieser Regionen lassen sich die kleinen Klone zu einer Sequenz anordnen. So erhält man eine Contig-Karte.



8.5 STS-Kartierung mithilfe von Restriktionsenzymen

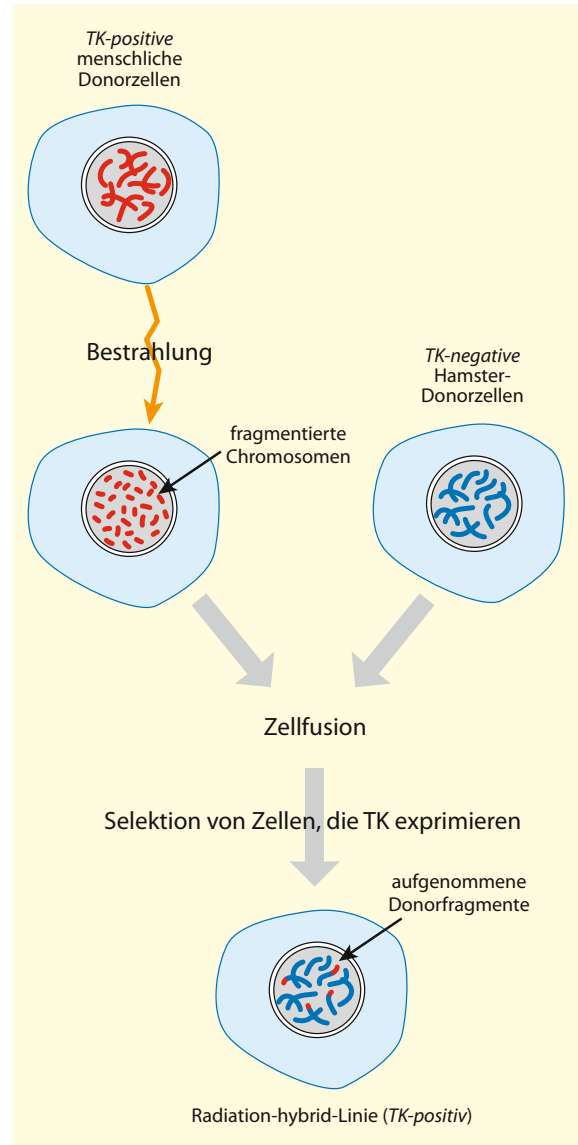
Die STS-Kartierung ist für vier STS-Stellen auf einem einzelnen Chromosom dargestellt. Mittels mehrfachem Verdau mit Restriktionsenzymen wird das Chromosom in zahlreiche verschieden große Fragmente zerschnitten. Wie nahe zwei Marker beieinander liegen, kann man daraus ableiten, wie oft zwei STS-Sequenzen auf demselben Fragment zu finden sind. In diesem Beispiel befinden sich die beiden violett gefärbten STSs sechsmal auf demselben Fragment, sie müssen also auf dem Chromosom eng beieinander liegen. Die beiden grünen STSs tauchen hingegen nur zweimal auf demselben Fragment auf, liegen also weiter voneinander entfernt. Da die violetten und grünen STSs nie gemeinsam auf einem Fragment vorkommen, müssen sie ziemlich weit auseinander liegen.

Physikalische Karten beruhen auf der tatsächlichen Distanz in Basenpaaren. Feststellen kann man diese Distanzen mithilfe von Markern wie ESTs und STSs. Contig-Karten werden anhand der überlappenden Regionen von Klonen erstellt. Die Sequenzen der überlappenden Klone sind zusammenhängend und liefern die Information zur Erstellung physikalischer Karten.

Radiation-hybrid-mapping und cytogenetische Chromosomenkarten

Nicht immer sind Klone aus DNA-Bibliotheken verlässlich. Große geklonte Abschnitte können beispielsweise aus zwei DNA-Fragmenten aus verschiedenen Bereichen des Genoms bestehen, die in den gleichen Vektor eingebaut wurden. Umgehen lässt sich diese Einschränkung durch die Analyse von STSs und ESTs auf den Originalchromosomenfragmenten mittels der Technik des **Radiation-hybrid-mappings** (Abb. 8.7). Um diese Chromosomenfragmente zu erzeugen, werden kultivierte menschliche Zellen mit Röntgenstrahlen oder γ -Strahlen (Gammastrahlen) bestrahlt, was zu Chromosomenbrüchen führt. Durch die Strahlungsdosis kann man die Zahl der Brüche steuern und somit die durchschnittliche Länge der Fragmente beeinflussen. Menschliche Zellen besitzen ein Markerenzym, das es ihnen ermöglicht, auf Selektivmedien zu wachsen. Nach der Bestrahlung werden die menschlichen Zellen mithilfe von Polyethylenglykol oder dem Sendaivirus mit kultivierten Hamsterzellen fusioniert. Die Hamsterzellen weisen den selektiven Marker nicht auf. Folglich überleben nur mit menschlichen Zellen fusionierte Hamsterzellen. Die Fragmente der menschlichen Chromosomen werden in den Hamsterzellkern aufgenommen, und man kann die einzelnen Hybridzelllinien durch STS- oder EST-Kartierung analysieren. Da die durchschnittliche Fragmentlänge bekannt ist, kann man mithilfe dieser Karten die relative Distanz zwischen zwei Markern feststellen.

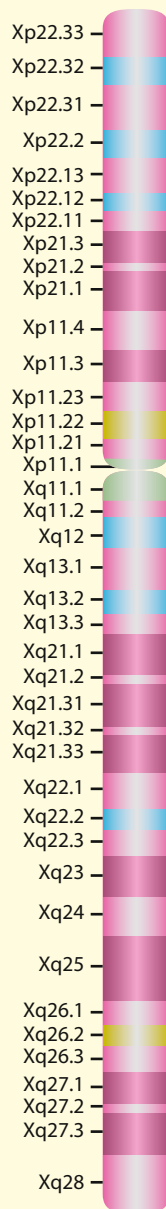
Eine weitere Technik zur physikalischen Kartierung ist die cytogenetische Kartierung, für die man Originalchromosomen verwendet. Auf einen Objektträger aufgebracht und angefärbt bilden Chromosomen charakteristische Bandenmuster aus, die im Lichtmikroskop erkennbar sind. Diese **cytogenetische Chromosomenkarte** zeigt, wo ein Gen oder



8.7 Radiation-hybrid-mapping

Um festzustellen, wie nahe beieinander STSs und ESTs liegen, muss man viele große Chromosomenfragmente analysieren. Mithilfe des Radiation-hybrid-mappings können große menschliche Chromosomenfragmente in Hamsterzellen eingebracht werden. Zunächst werden diejenigen menschlichen Chromosomen, die das Gen für Thymidin-Kinase (TK⁺) tragen, durch Bestrahlung in Fragmente zerbrochen. Anschließend kann man die menschlichen Zellen mit (TK⁻) Hamsterzellen fusionieren. Die so entstehenden Hybridzellen sollten Thymidin-Kinase exprimieren und auf Selektivmedium wachsen. Da es bei diesem Vorgang zu einem zufälligen Verlust menschlicher Chromosomenfragmente kommt, weist jede so erzeugte Hybridzelllinie einen anderen Satz menschlicher Chromosomenfragmente auf, die man dann auf STSs und ESTs untersuchen kann.

X-Chromosom



8.8 Bandenmuster auf dem X-Chromosom

Färbt man kondensierte Mitosechromosomen mit verschiedenen DNA-bindenden Farbstoffen an, so bildet sich ein charakteristisches Bandenmuster. Im Verhältnis zu diesem Muster kann man dann die Position eines Gens oder eines Markers bestimmen. So befindet sich beispielsweise ein Gen am Genort Xp21.1 auf dem kurzen Arm (p) des X-Chromosoms bei der Bande mit der Nummer 21.1.

ein Marker relativ zu den angefärbten Banden liegt (Abb. 8.8). Cytogenetische Chromosomenkarten weisen im Vergleich zu den anderen Kartierungstechniken eine sehr geringe Auflösung auf, eignen sich jedoch, um die Lage von Genen in größerem Maßstab zu vergleichen.

Durch Radiation-hybrid-mapping lässt sich die Anordnung physikalischer Marker wie STSs und ESTs auf größeren Abschnitten menschlicher Chromosomen feststellen.

Menschliche Chromosomen sind durch charakteristische Bandenmuster gekennzeichnet, anhand derer man die Reihenfolge physikalischer Marker ermitteln kann.

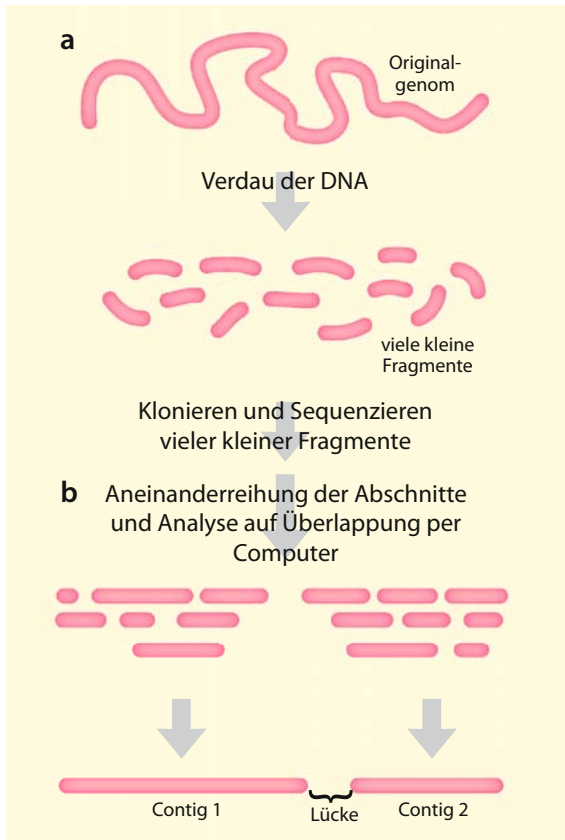
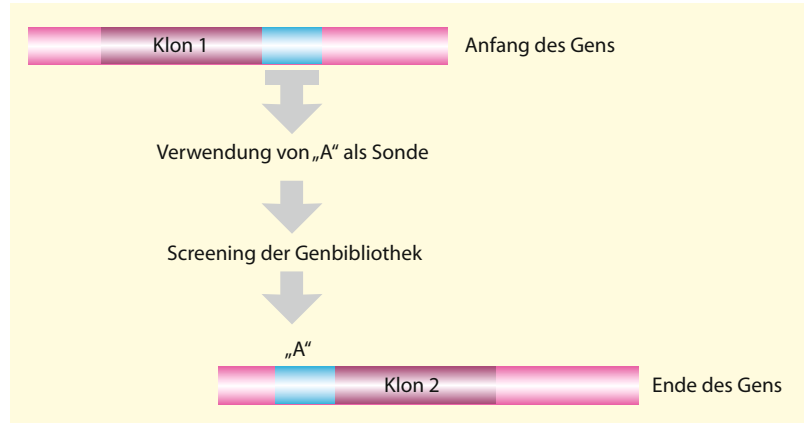
Sequenzierung ganzer Genome

Das gesamte Genom eines Organismus kann auf unterschiedliche Weise sequenziert werden. Mit der Methode des *chromosome walking* („Wanderung auf dem Chromosom“) kann man einen Klon identifizieren, sequenzieren und anhand dieser Daten nach überlappenden Klonen suchen (Abb. 8.9). Sind auch diese identifiziert und sequenziert, sucht man davon ausgehend wieder nach überlappenden Klonen und identifiziert auch diese. Dieser Prozess läuft auf dem Chromosom in beide Richtungen. So wird die Sequenz Stück für Stück zusammengesetzt. Der erste Klon wird in der Regel relativ zu einem bestimmten Marker lokalisiert, etwa einem STS oder RFLP. Häufig eingesetzt wird das *chromosome walking* zur Charakterisierung der Gene für eine bestimmte Krankheit. Vielleicht haben DNA-Analysen von Patienten einen bestimmten RFLP ergeben, der bei Betroffenen stets vorhanden ist, bei gesunden Menschen hingegen nicht. Dieser RFLP kann dann in einem Bibliotheksklon identifiziert werden. Durch *chromosome walking* in beide Richtungen von dem RFLP lässt sich dann hoffentlich die gesamte Gensequenz ermitteln.

Obwohl sich das *chromosome walking* als sehr effektiv für die Identifizierung von Genen erwiesen hat, ist diese Methode zum Sequenzieren ganzer Genome zu mühsam. Deshalb ermittelt man die Sequenzdaten eines ganzen Genoms mit der sogenannten *shotgun-Sequenzierung* (Abb. 8.10). Dazu werden Genombanken erstellt und nach dem Zufallsprinzip

8.9 Chromosome walking

Durch die Methode des *chromosome walking* kann man die einem Gen benachbarten Regionen identifizieren. In diesem Beispiel wurde das Ende des Klon 1 als Sonde verwendet. Mithilfe dieser Sonde erfolgt das Screening einer Genbibliothek, bis ein zweiter Klon identifiziert ist. Die beiden Klone überlappen und werden dann zu einem vollständigen Gen verbunden.



8.10 Shotgun-Sequenzierung

Der erste Schritt bei der *shotgun*-Sequenzierung ist der Verdau des Genoms in kleine Fragmente, die jeweils einzeln kloniert und sequenziert werden können. Die Sequenzdaten werden dann per Computer auf überlappende Bereiche analysiert und zu mehreren größeren Contigs zusammengefügt. Da sich einige Bereiche des Genoms bei der Klonierung als instabil erweisen, bleiben selbst nach mehrmaliger Wiederholung dieser Prozedur immer noch einige Lücken.

Klone sequenziert. Sämtliche Sequenzinformationen werden von einem Computer ausgewertet und auf überlappende Regionen zwischen den Sequenzen analysiert. Danach kann man die Klone zu einer vollständigen Sequenz aneinanderreihen. Der Vorgang wird so lange wiederholt, bis möglichst viele Lücken eliminiert sind. Mit dieser Methode wurde beispielsweise das erste zelluläre Genom des Grippeerregers *Haemophilus influenzae* sequenziert. Die vollständige *shotgun*-Sequenzierung dieses 1,8 Mb großen Genoms dauerte weniger als drei Monate.

Große Genome kann man durch *chromosome walking* sequenzieren. Dabei versucht man, mithilfe des einen Endes eines Klonen einen anderen mit teilweise überlappenden Sequenz zu finden. Mithilfe der *shotgun*-Sequenzierung wurde beispielsweise das menschliche Genom sequenziert. Hierbei werden willkürlich einzelne Bibliotheks-klone sequenziert. Per Computer und durch die Identifizierung überlappenden Regionen können die Klone in die richtige Reihenfolge gebracht werden.

Der Wettlauf um das menschliche Genom

Das Humangenomprojekt (Human Genome Project) ist ein staatlich gefördertes Programm zur Sequenzierung des gesamten, drei Milliarden Basenpaare umfassenden, menschlichen Genoms. Gestartet wurde das Projekt 1990 und innerhalb von 15 Jahren fertig gestellt. Die Kettenabbruchmethode

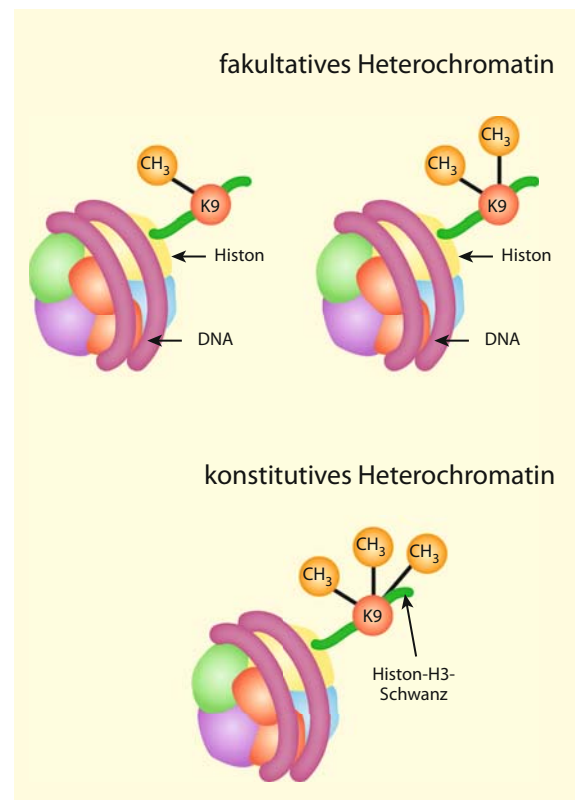
der DNA-Sequenzierung wurde zwar verbessert, dennoch stellte es eine große Herausforderung dar, pro Tag mehr als 1000 Basenpaare zu sequenzieren. Nach den ersten zehn Jahren war es gelungen, die Sequenzierungsgeschwindigkeit erheblich zu steigern und die Kosten pro Base von zehn Dollar im Jahr 1990 auf rund 50 Cents pro Base Ende der 1990er-Jahre zu senken. Im Jahr 1998 beschloss das Unternehmen Celera Genomics unter der Leitung von Craig Venter, das gesamte menschliche Genom schneller und kostengünstiger zu sequenzieren. Celera Genomics erhärtete seinen Standpunkt durch die Sequenzierung des gesamten, 180 Mb großen Genoms der Taufliege (*Drosophila*) zwischen Mai und Dezember 1999. Verwendet wurde dazu die *shotgun*-Sequenzierung, von der die meisten Wissenschaftler geglaubt hatten, sie eigne sich nicht für so große Datenmengen. Celera Genomics hielt aber weiter an der *shotgun*-Methode fest. Das offizielle Humangenomprojekt war erst zu 85 % abgeschlossen, als Celera verkündete, bereits 99 % des menschlichen Genoms sequenziert zu haben. Im Juni 2000 wurde in einer gemeinsamen Mitteilung von Celera Genomics und dem Humangenomprojekt ein erster Entwurf der gesamten Sequenz des menschlichen Genoms veröffentlicht.

Das Humangenomprojekt hatte mit einer guten Sequenzierungsstrategie begonnen. Als Erstes bestimmte man die Positionen großer Fragmente der menschlichen DNA (wie YACs und BACs) und kartierte sie auf den Chromosomen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente sequenziert. Wie bereits beschrieben, ist die Kartierung sehr zeitaufwendig, aber notwendig, um die Sequenzdaten in die richtige Reihenfolge zu bringen. Zu Beginn des Projekts waren die damaligen Computer nicht in der Lage, mehr Sequenzdaten als die von großen Chromosomensegmenten aneinanderzureihen. Im Laufe der 1990er-Jahre stieg deren Leistungsfähigkeit jedoch so sprunghaft an, dass Craig Venter die Kartierungsschritte für unnötig hielt. Also sequenzierte er viele kleine DNA-Fragmente. Der Computer erstellte aus diesen Informationen dann einen Arbeitsentwurf. Seine Konkurrenz konnte Venter vor allem aufgrund der gestiegenen Leistungsfähigkeit der Computer überflügeln.

Das menschliche Genom wurde mit der Methode der *shotgun*-Sequenzierung sequenziert. Das Ergebnis lag viel schneller und unter geringerem Kostenaufwand vor, als zunächst veranschlagt.

Das menschliche Genom weist noch Lücken auf

Das Genom des Menschen gilt zwar als vollständig sequenziert, weist aber dennoch Lücken auf. Diese Lücken befinden sich in den stark kondensierten Abschnitten aus hoch repetitivem **Heterochromatin**, das schwer zu sequenzieren ist. Drei Merkmale sind kennzeichnend für Heterochromatin: Hypoacetylierung (d.h. Mangel an Acetylgruppen an den Histonen); Methylierung des Histons H3 an bestimmten Lysinresten; und Methylierung an CpG- oder CpNpG-Sequenzmotiven. Heterochromatin wird nicht transkribiert und kommt in zwei Formen vor, als **fakultatives Heterochromatin** und als **konstitutives Heterochromatin** (Abb. 8.11). Die konstitutive Form findet sich im Bereich der Centromere und Telomere der Chromosomen und erfährt von Generation zu Generation keine Veränderungen.



8.11 Fakultatives und konstitutives Heterochromatin Fakultatives unterscheidet sich von konstitutivem Heterochromatin unter anderem durch die Methylierung am Lysinrest 9 und an Histon H3.

Das fakultative Heterochromatin hingegen ist in anderen Regionen der Chromosomen zu finden; ob es vorhanden ist, ist zellspezifisch. Hat sich eine bestimmte Region eines Chromosoms zu Heterochromatin verdichtet, bleibt dieses Muster bei allen Tochterzellen erhalten. Bei benachbarten Zellen findet sich das Heterochromatin jedoch nicht immer in den gleichen Regionen; das führt zur sogenannten **Positionseffekt-Variegation (PEV)**. Man nimmt an, dass sich das Heterochromatin als Abwehr gegen eindringende Retrotransposons und Viren bildet und auch aufgrund von Gen-Silencing bei der RNAi (s. Kap. 5). Befindet sich ein Gen in der Nachbarschaft eines Heterochromatinabschnitts, wird es nicht mehr transkribiert und gelangt in einen Ruhezustand.

Ob Heterochromatin als fakultativ oder konstitutiv betrachtet wird, hängt von der Methylierung am Lysinstrest 9 und an Histon H3 ab.

Heterochromatin ist stark kondensierte DNA, die an bestimmten Stellen des Genoms vorkommt. Aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften ist es sehr schwer zu sequenzieren. Das konstitutive Heterochromatin im Bereich des Centromers ist im gesamten Körper gleich, während das fakultative Heterochromatin von Person zu Person und von Organ zu Organ variiert.

Analyse des menschlichen Genoms

Die Länge der Sequenz des menschlichen Genoms beträgt $2,9 \times 10^9$ Basenpaare (2,9 Gbp oder Gigabasenpaare). Würde man die gesamte Sequenz mit etwa 3000 Buchstaben pro Seite auf Papier niederschreiben, ergäben sich eine Million Seiten Text. Diese überwältigende Menge an Informationen ist ausschließlich in der Abfolge von nur vier Basen codiert: Cytosin, Adenin, Guanin und Thymin. Die meisten Menschen erwarten, dass sich durch die Sequenz des menschlichen Genoms die tatsächliche Zahl der Gene des Menschen feststellen lässt. Um die Zahl der enthaltenen Gene zu bestimmen, muss man jedoch große Teile der Sequenz einer genaueren Interpretation unterziehen. Schätzungen zufolge geht man derzeit von nur etwa 25 000 Genen aus, die Zahl könnte allerdings auch darunter oder darüber liegen.

Von nur etwa der Hälfte der identifizierten Gene kennt man die Funktion. Mehr als 40 % der vorhergesagten menschlichen Proteine ähneln in ihrer Struktur Proteinen von Organismen wie Taufliedern oder Würmern.

In Tabelle 8.1 sind die Genomgrößen und geschätzten Genzahlen einiger Organismen aufgeführt. Wie man sieht, halten Pflanzen derzeit den Rekord bezüglich der Zahl der Gene, obwohl sie insgesamt weniger DNA aufweisen als höhere Tiere. Unter den Tieren hat das Pantoffeltierchen *Paramecium*, ein zu den Ciliaten (Wimpertierchen) zählender Protozoe, weniger DNA, aber mehr Gene als sämtliche bisher sequenzierten vielzelligen Tiere. Die größten Bakteriengenome umfassen mehr Gene als die kleinsten Eukaryotengenome. Dies verdeutlicht beispielhaft *Streptomyces*, das als wichtige Quelle vieler Antibiotika dient. Die kleinsten Bakteriengenome, wie das von *Mycoplasma*, umfassen weniger als 500 Gene. Als Parasiten sind diese Bakterien auf viele Metaboliten der Eukaryoten angewiesen, die sie infizieren.

Bei eukaryotischer DNA machen die Gene Tausende oder sogar Millionen von Basenpaaren aus. Bei den meisten handelt es sich jedoch um Introns, die durch Spleißen aus dem mRNA-Transkript herausgeschnitten werden. So ist beispielsweise das Gen für Dystrophin (das bei Duchenne-Muskeldystrophie fehlerhaft ist) 2,4 Millionen Basenpaare lang, einige seiner Introns umfassen zum Teil über 100 000 Basenpaare. Im Gegensatz dazu umfasst die aus mehreren Exons bestehende codierende Sequenz nur etwa 3000 Basenpaare. In solchen Fällen ist es nicht immer einfach, inmitten der nichtcodierenden DNA die tatsächlich codierenden Sequenzen zu finden. Einerseits kann es dadurch passieren, dass manche Gene (oder einzelne Exons) völlig übersehen werden. Andererseits werden bisweilen weit voneinander entfernt liegende Exons, die in Wirklichkeit Teile einer einzelnen codierenden Sequenz sind, als eigenständige Gene interpretiert.

Ein weiterer Störfaktor beim Feststellen der Genzahl sind die sogenannten **Pseudogene**. Dabei handelt es sich um duplizierte Kopien echter Gene, die defekt sind und nicht mehr exprimiert werden. Allein anhand von Sequenzdaten festzustellen, ob ein Gen wirklich ein echtes Gen ist oder nur ein Pseudogen, erweist sich häufig als schwierig. Oft muss die Expression einer bestimmten DNA-Region dadurch bestätigt werden, dass man die entsprechenden mRNA-Transkripte findet. Eine beliebte Methode, um festzustellen, ob ein Gen exprimiert wird, stellen DNA-Microarrays dar (s. weiter unten).

Tabelle 8.1 Verschiedene Genome und die geschätzte Zahl der Gene

Organismus	Genomgröße (Megabasenpaare)	geschätzte Zahl der (proteincodierenden) Gene
Pflanzen		
Westliche Balsampappel (<i>Populus trichocarpa</i>)	500	45 000
Reis (<i>Oryza sativa</i>)	390	38 000
Ackerschmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	125	26 000
Tiere		
<i>Paramecium tetraurelia</i> (Pantoffeltierchen)	72	40 000
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	2900	25 000
Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	2500	25 000
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)	97	19 000
<i>Drosophila melanogaster</i> (Taufliege)	180	13 600
Pilze		
<i>Aspergillus nidulans</i> (Schimmel)	30	9500
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Backhefe)	13	5800
Bakterien		
<i>Streptomyces coelicolor</i>	8,7	7800
<i>Escherichia coli</i>	4,6	4300
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58	470

Die Zahl der Gene hängt auch davon ab, was man als Gen definiert. Zusätzlich zu den rund 25 000 proteincodierenden Genen gibt es noch mindestens tausend weitere Gene, die für nichttranslatierte RNA codieren. Am bekanntesten sind die Gene für ribosomale RNA (rRNA) und transfer-RNA (tRNA). Es gibt jedoch noch eine Reihe weiterer kleiner RNA-Moleküle, die am Spleißen der mRNA und an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Andere DNA-Sequenzen werden überhaupt nicht transkribiert, sind aber dennoch von Bedeutung. Sollten wir diese ebenfalls als Gene betrachten?

Die Anzahl der Gene eines Organismus hängt von der Definition ab, was ein Gen ist, sowie von der Unterscheidung zwischen Genen und Pseudogenen. Die absoluten Genzahlen einer Sequenz stellen nur einen annähernden Wert dar.

Nichtcodierende Bestandteile des menschlichen Genoms

Im Genom des Menschen und vieler anderer Organismen hat man zahlreiche nichtcodierende DNA-Elemente identifiziert. Einige Wissenschaftler haben diese Regionen als **junk DNA** („unnütze“ oder „wertlose“ DNA) bezeichnet, weil sie weder in Form von Proteinen noch als RNA exprimiert wird und es sich dabei auch nicht um mit Genen assoziierte regulatorische Regionen handelt. Ein Teil dieser DNA erfüllt aber dennoch eine Funktion. In den Tabellen 8.2 und 8.3 sind die wichtigsten Bestandteile des menschlichen Genoms zusammengefasst und die jeweiligen Anteile angegeben.

Eine verbreitete Form nichtcodierender DNA sind die Introns zwischen den Genen. Die meisten Introns sind funktionslos, vereinzelt finden sich aber

auch ganze Gene innerhalb der Introns anderer Gene. Introns können auch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten und daher eine Rolle bei der Genregulation spielen.

Ein weiteres Merkmal des Genoms sind mäßig repetitive Sequenzen. Gene für ribosomale RNA finden sich in großer Zahl, weil viele Ribosomen gebraucht werden. Diese Gene zählen zu den mittelrepetitiven

Sequenzen, und zwar zu den codierenden. Zu den nichtcodierenden repetitiven Elementen zählen **LINEs** (für engl. *long interspersed nuclear elements*), die in 200 000 bis 500 000 Kopien vorliegen (Abb. 8.12). Dabei handelt es sich um Retroviren-ähnliche Elemente (Retroelemente), die in langen endständigen Sequenzwiederholungen (LTRs, *long terminal repeats*) Gene enthalten, welche Retroviren ähneln. Diese sind

Tabelle 8.2 Bestandteile des Eukaryotengenoms

einzigartige Sequenzen	
proteincodierende Gene – einschließlich strangaufwärts gelegener Regulationsregionen, Exons und Introns	
für nichttranslatierte RNA (snRNA, snoRNA, 7SL-RNA, Telomerase-RNA, Xist-RNA, verschiedene kleine regulatorische RNAs) codierende Gene	
nichtrepetitive, intragene nichtcodierende DNA	
verstreute repetitive DNA	
Pseudogene	
SINEs (<i>short interspersed nuclear elements</i> – kurze, eingestreute Kernsequenzelemente)	
Alu-Element (300 bp)	ca. 1 000 000 Kopien
MIR-Familien (im Schnitt ca. 130 bp) (<i>mammalian-wide interspersed repeat</i>)	ca. 400 000 Kopien
LINEs (<i>long interspersed nuclear elements</i> – lange, eingestreute Kernelemente)	
LINE-1-Familie (im Schnitt ca. 800 bp)	ca. 200 000–500 000 Kopien
LINE-2-Familie (im Schnitt 250 bp)	ca. 270 000 Kopien
Retrovirus-ähnliche Elemente (Retroelemente; 500–1300 bp)	ca. 250 000 Kopien
DNA-Transposons (variabel; im Schnitt ca. 250 bp)	ca. 200 000 Kopien
tandem-repetitive DNA	
Gene für ribosomale RNA	5 Cluster aus etwa 50 Tandem-repeats auf 5 verschiedenen Chromosomen
Gene für transfer-RNA	zahlreiche Kopien plus mehrere Pseudogene
Telomersequenzen	mehrere kb eines 6-bp-Tandem-repeats
Minisatelliten (= VNTRs)	0,1–20 kbp Blöcke aus kurzen Tandem-repeats (STRs, 5–50 bp), meist in Telomernähe
Centromersequenz (α -Satelliten-DNA)	171-bp Repeat, bindet Centromerproteine
Satelliten-DNA	100 kbp oder längere Blöcke aus Tandem-repeats (20–200 bp), meist in Centromernähe
Megasatelliten-DNA	100 kbp oder längere Blöcke aus Tandem-repeats (1–5 kbp), verschiedene Positionen

Die Zahl der Kopien ist für das menschliche Genom angegeben.

autonom, d.h. die LINES können sich selbst replizieren und neue Kopien an anderen Stellen des Genoms einfügen. Die meisten Kopien der LINES sind jedoch defekt; nur einige wenige sind mobil und funktionsfähig. Es gibt viele verschiedene Typen von LINES, das bei Säugetieren weitaus häufigste ist L1.

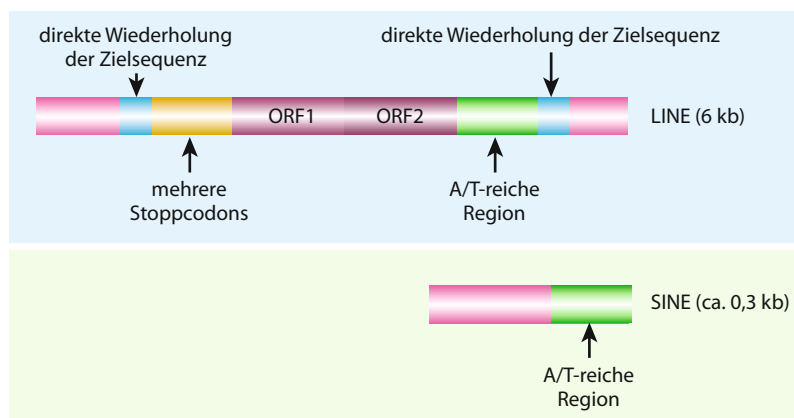
LINE-Retroelemente werden mithilfe eines internen Promotors in mRNA transkribiert. Die mRNA wandert dann ins Cytoplasma und wird dort an den Ribosomen translatiert, wodurch Proteine entstehen. Durch Bindung eines dieser Proteine mit Doppelfunktion als Reverse Transkriptase und Endonuclease

an mRNA bildet sich ein **Ribonucleoprotein (RNP)**. Dieses wird wieder zurück zum Zellkern transportiert, wo der Endonuclease-Anteil in der DNA einen Einzelstrangbruch und somit ein freies 3'-OH-Ende erzeugt. Anschließend stellt der Reverse-Transkriptase-Anteil eine DNA-Kopie des LINES her, die dann an einer anderen Stelle im Genom eingefügt wird. Reparaturenzyme der Zelle füllen die Lücken und erzeugen auf beiden Seiten des neuen LINES flankierende duplizierte Sequenzen. Bei der Wanderung an einen neuen Ort kann ein LINE ein wichtiges Gen unterbrechen, was sich für die Zelle als fatal erweisen kann. Daher ist eine strikte Kontrolle der LINE-Wanderungen wichtig. Zu viele Wanderungen sind schädlich und können sowohl die Wirtszelle als auch die darin enthaltenen LINES zerstören. Bei zu wenigen Wanderungsbewegungen hingegen kann es vorkommen, dass sich die LINES nicht effektiv vermehren. Beim Menschen finden sich viele LINES in genarmen, A/T-reichen Regionen des Genoms; das legt nahe, dass ein Mechanismus diese Elemente davon abhält, die Zellfunktion zu zerstören.

Neben den mittelrepetitiven Sequenzen enthält das menschliche Genom auch hochrepetitive DNA. Die **SINES** (*short interspersed nuclear elements*) (s. Abb. 8.12) sind wie die LINES ebenfalls Retroelemente. Die häufigsten Vertreter der SINES sind die **Alu-Sequenzen**, so genannt, weil in diesem Abschnitt eine Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuclease *Alu* liegt. Im menschlichen Genom gibt es rund 300 000 bis 500 000 Alu-Sequenzen. SINES können ohne das Reverse-Transkriptase-/Endonuclease-Protein der LINES nicht an andere Stellen des Genoms wandern. Im Gegensatz zu den LINES liegen die SINES in genreichen Regionen des menschlichen Genoms, sie sind jedoch kürzer und

Tabelle 8.3 Anteile der Bestandteile am menschlichen Genom

genetisch aktiv	
25 %	in RNA transkribiert
24 %	Introns (durch Spleißen entfernt)
1 %	Exons (in Proteine translatiert)
Retroelemente	
13 %	SINES
20 %	LINES
8 %	(nichtinfektiöse) endogene Retroviren
sonstige DNA	
4 %	DNA-Transposons
3 %	Mikrosatelliten und VNTRs
5 %	repetitive DNA an Telomeren und Centromeren
22 %	nichtrepetitive, intergene DNA



8.12 Allgemeine Struktur von LINES und SINES

LINES enthalten einen internen Promotor für RNA-Polymerase II und zwei offene Leseraster, die für Proteine codieren. Die Funktion des ersten Proteins ist noch nicht bekannt. Beim zweiten handelt es sich um ein bifunktionales Protein mit Reverse-Transkriptase- und Endonuclease-Domänen. SINES enthalten in der Regel nur einen internen Promotor für RNA-Polymerase III und eine Art tRNA-Stamm-Schleife-Struktur, gefolgt von einem Poly(A)-Schwanz.

oft reaktionsträge; daher beeinträchtigt ihr Vorhandensein die Genfunktion in der Regel nicht.

Ein weiterer Typ hochrepetitiver Sequenzen im Genom des Menschen sind die **Minisatelliten** oder VNTRs (*variable number tandem repeats*). Diese sind über das gesamte Genom verstreut und wurden zu dessen Kartierung verwendet (s. weiter vorne).

Junk DNA oder nichtcodierende genomische DNA enthält viele verschiedene Formen von Sequenzen, darunter LINEs, SINEs, und Satelliten-DNA.

LINEs werden in RNA transkribiert und in Proteine umgewandelt. Eines dieser Proteine schließt sich wieder mit der mRNA zusammen. Der RNP-Komplex wandert zurück in den Kern und fügt sich dort an einer neuen Stelle im Genom ein.

Bioinformatik und Computeranalyse

Wie bereits erwähnt, haben Computer das Sammeln und Analysieren genetischer Daten revolutioniert. Für die aufstrebende wissenschaftliche Disziplin, die sich mit dem Einsatz von Computern zur Verarbeitung biologischer Informationen befasst, wurde der Begriff **Bioinformatik** geprägt. Die Bioinformatik beinhaltet eine große Zahl von Gebieten (Tabelle 8.4) und umfasst das Speichern, Abrufen und die Ana-

lyse biomolekularer Daten. Die bei weitem größte Leistung der bioinformatischen Revolution war die Sequenzierung des Humangenoms. Heute wird der Begriff *Bioinformatik* auch im Zusammenhang mit Analysen verwendet, die mit DNA-Microarrays zusammenhängen (s. unten) und bei denen es um die Feststellung von Genomfunktionen geht.

Aufgrund des breiten Anwendungsbereichs der Bioinformatik ist es von grundlegender Bedeutung, dass den Wissenschaftlern genomische Daten zur Verfügung stehen. Die Daten des Humangenomprojekts sind beispielsweise im Internet auf der Seite des National Center of Biotechnology Information abrufbar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Unten sind einige weitere Webseiten aufgelistet, die Sequenzdaten zur Verfügung stellen. Das Humangenom lässt sich auf der Seite des NCBI auf vielerlei Weise analysieren. Mit der Metasuchmaschine Entrez Gene kann man bestimmte Gene namentlich identifizieren. Für jedes Gen ist sein Name und eine Beschreibung hinterlegt, dazu der Genort, eine grafische Darstellung der Introns und Exons für alle bekannten Proteinisoformen sowie eine Zusammenfassung sämtlicher bekannter Geninformationen. Zusätzlich sind die verschiedenen Domänen des Proteins wie Aktinbindungsstellen aufgeführt, zusammen mit entsprechenden Links zur Erläuterung der Domäne und ihrer Funktion. Schließlich sind auch noch Gene und/oder DNA-Abschnitte anderer Organismen dargestellt, die zu dem abgebildeten Gen homolog sind. Weiterhin enthält die Seite Links zu Forschungsartikeln über die Funktion des Gens.

Tabelle 8.4 Mit der Bioinformatik verwandte Forschungsgebiete

Gebiet	Beschreibung
Computerbiologie	Evolutions-, Populations- und theoretische Biologie; statistische Modelle für biologische Phänomene
medizinische Informatik	Verwendung von Computern zur Verbesserung von Kommunikation, Verständnis und Management medizinischer Informationen
Chemoinformatik	Kombination von chemischen Synthesen, biologischen Screenings und Datengewinnung zur Entdeckung und Entwicklung von Arzneistoffen
Genomik	Analyse und Vergleich der gesamten genetischen Ausstattung einer oder mehrerer Arten
Proteomik	globale Erforschung von Proteinen
Pharmakogenetik	Identifizieren individueller Unterschiede in der Reaktion auf Arzneimittel mithilfe von genomischen/bioinformatischen Methoden
Pharmakogenomik	Identifikation von Drug-targets (Wirkstoffzielverbindungen) mithilfe der Genomik

Einige Bioinformatik-Webseiten:

- GenBank und damit verbundene Datenbanken
 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>
 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>
 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>
- Institute for Genomics Research (TIGR)
 - <http://www.tigr.org/tdb>
- Genome Database (GDB) (Humangenom)
 - <http://www.gdb.org>
- European Bioinformatics Institute (einschließlich EMBL und Swissprot)
 - <http://www.ebi.ac.uk/>
- Flybase (*Drosophila*-Genom)
 - <http://flybase.bio.indiana.edu:82>
- RCSB Protein Data Bank
 - <http://www.rcsb.org/pdb/>
- PIR Protein Information Resource (PIR)
 - <http://pir.georgetown.edu/pirwww/index.shtml>

Mit dem Programm Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) kann man das menschliche Genom auch ohne Vorstellung von einem konkreten Gen durchsuchen. So lassen sich beispielsweise über eine grafische Benutzeroberfläche einzelne Chromosomen genau betrachten; dabei kann man in verschiedene Regionen hinein- und hinauszoomen. Ein weiterer **Genom-Browser** findet sich unter <http://www.ensembl.org>.

Das Humangenomprojekt hat eine riesige Menge an Daten und Informationen geliefert, die sich ohne den Einsatz von Computern gar nicht bewältigen lässt. Das gezielte Durchsuchen genomischer Datenbanken mithilfe von Computerprogrammen und das Auswerten dieser Daten bezeichnet man mit dem Überbegriff **Data-Mining**. Viele Bioinformatiker entwickeln Programme, mit denen man Datenbanken durchsuchen und die rohen Sequenzdaten herausfiltern und sortieren kann. Data-Mining-Programme verarbeiten Informationen häufig über die folgenden Schritte:

1. Auswahl der interessierenden Daten.
2. Datenaufbereitung oder „Datenbereinigung“. Eliminieren unnötiger Informationen, um eine Verlangsamung oder Hemmung der Analyse zu vermeiden.
3. Umwandlung der Daten in ein für die Analyse zugängliches Format.
4. Extraktion von Mustern und Beziehungen aus den Daten.
5. Interpretation und Bewertung.

Diese Programme können darauf ausgerichtet sein, nach verwandten Sequenzen zu suchen, durch Feststellen des Codongebrauchs Abschnitte codierender und nichtcodierender DNA zu bestimmen oder nach bekannten Consensussequenzen zu suchen – um nur einige Anwendungen zu nennen. Mittels der **Ähnlichkeitssuche** nach verwandten Sequenzen können Forscher die potenzielle Funktion eines Gens identifizieren. Weist ein menschliches Gen unbekannter Funktion eine große Ähnlichkeit mit einem charakterisierten Gen von Fliegen auf, dann könnten die beiden codierten Proteine ebenfalls ähnliche Funktionen erfüllen. Dieses Forschungsfeld nennt man **vergleichende Genomik**. Man kann auch mehr als ein Gen vergleichen. So sind häufig ganze Synthesewege bei verschiedenen Arten ähnlich. Menschliches Insulin bindet zum Beispiel an einen Rezeptor an der Zelloberfläche und kontrolliert über mehrere intrazelluläre Proteine die Gentranskription. Bemerkenswerterweise finden sich bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* sehr ähnliche Insulinsignale.

Probleme können sich ergeben, wenn Wissenschaftler ein neues Protein ausschließlich mittels vergleichender Genomik überprüfen. Manchmal erfüllen ähnliche Sequenzen radikal andere Funktionen, da ähnliche Proteine im Laufe der Evolution neue Funktionen übernehmen. Schließlich sind auch die Datenbanken selbst nicht perfekt und können Fehler enthalten. Deshalb muss die vergleichende Genomik mit anderen Studien ergänzt werden, um die Funktion eines neuen Proteins verlässlich zu ermitteln.

Andere Programme bestimmen anhand des **Codongebrauchs** (engl. *codon bias* oder *codon usage*) codierende und nichtcodierende Bereiche des Genoms. Um Gene zu finden, muss man zunächst die codierenden Abschnitte identifizieren. Dazu wird die Wobble-Position (dritte Base) des Codons betrachtet. Auch wenn eine bestimmte Aminosäure häufig durch mehrere verschiedene Codons codiert wird, werden doch einige bevorzugt verwendet. Dieser unterschiedliche Codongebrauch variiert von Organismus zu Organismus. Die meisten tRNAs für eine bestimmte Aminosäure erkennen das favorisierte Codon (bzw. die favorisierten Codons). So verwenden beispielsweise die Gene von *Escherichia coli* für die Aminosäure Arginin bevorzugt die Codons CGA, CGU, CGC und CGG, aber nur selten AGA oder AGG. Für Arginin werden nur sehr wenige tRNAs produziert, die die Codons AGA und AGG erkennen. In Regionen, die für Proteine codieren, tritt der Codongebrauch somit deutlich zutage, in nicht-

codierenden Regionen ist dies nicht der Fall. Ein potenzielles Gen von *E. coli* würde also relativ wenige AGA- und AGG-Codons enthalten.

Schließlich ermöglichen Programme zum Erkennen von Consensussequenzen den Wissenschaftlern, verschiedene Signaturen oder Motive zu finden, die mit bestimmten Funktionen assoziiert sind. Beispielsweise enthält eine Sequenz, die an ATP bindet, an bestimmten Stellen bestimmte Aminosäuren. Bei einem unbekannten Protein könnten diese Sequenzen dazu beitragen, eine seiner Funktionen zu ermitteln. Weitere Motive sind Actinbindungsdomänen, ein Hinweis darauf, dass das Protein an das Cytoskelett bindet; oder Proteasespaltungsstellen, die nahe legen, dass das Protein intrazellulär durch Cellulasen modifiziert wird. Jedes potenzielle Motiv einer Sequenz muss experimentell bestätigt werden. So ist es beispielsweise erforderlich nachzuweisen, dass ein Protein mit einer ATP-Bindungsstelle im Experiment tatsächlich ATP bindet. Sequenzanalysen bilden damit eine Grundlage für weitere Experimente.

Bioinformatik ist die Analyse biologischer Informationen unter Verwendung von Computern.

Beim Data-Mining werden mithilfe von Computeralgorithmen Informationen aus Genomdatenbanken analysiert, sortiert und zusammengetragen. Informationen über Gene erhält man durch den Vergleich von Sequenzen verschiedener Organismen.

Medizin und Genomik

Zu den wichtigsten Anwendungsmöglichkeiten für Humangenomdaten zählt die Diagnose von Krankheiten. Die Genomik wird auf vielfältige Weise in der Medizin eingesetzt, auf einige der Anwendungen wird in den noch folgenden Kapiteln dieses Buches näher eingegangen. Die derzeit verbreitetste Anwendung stellen **Gentests** dar. Wenn der Zusammenhang zwischen Genen und bestimmten Krankheiten nachgewiesen ist, kann man Screenings auf Mutationen innerhalb dieses Gens durchführen. Mithilfe solcher Tests kann man beispielsweise Krankheiten wie Muskeldystrophie, cystische Fibrose, Sichelzellanämie und Chorea Huntington, also strikt erbliche Krankheiten, diagnostizieren. Bei Krankheiten mit einer Umweltkomponente liefern Gentests Informationen, die die betreffenden Personen veranlassen können, ihren Lebensstil zu ändern. So gehen Personen mit

einer Prädisposition für Darmkrebs vielleicht häufiger und früher als gewöhnlich zur Vorsorgeuntersuchung und ändern möglicherweise sogar ihre Ernährung, um die Chancen für den Krebs zu verringern. Zu weiteren Anwendungen gehört beispielsweise die Gentherapie (s. Kap. 17).

Die Genomik hat weitreichende Auswirkungen auf Biotechnologie und Medizin.

In der DNA häufen sich mit der Zeit Mutationen an

Das Humangenomprojekt hat auf vielen Gebieten die Türen für verbesserte Analysen geöffnet, so auch in der Evolutionsbiologie. Die Sequenzmerkmale des menschlichen Genoms entstanden vor Millionen von Jahren, als es zu **Mutationen** kam und diese an die nachfolgenden Generationen weitergegeben wurden. Im Laufe der Entwicklungsgeschichte des Menschen haben viele verschiedene Ereignisse unsere genetische Geschichte geformt und schließlich zu unserem heutigen genetischen Status geführt. Jedes Individuum hat durch genetische Rekombinationen und/oder Mutationen eine einzigartige körperliche und emotionale Konstitution erworben. Viele Genmutationen treten in allen Zellen des Körpers auf. Die meisten Zellen mit solchen Defekten sterben ab, machen eine Apoptose (Zelltod) durch (s. Kap. 20). Tritt eine Mutation in **somatischen Zellen** (Körperzellen) auf, erben die Kinder oder Nachkommen diese nicht; nur Mutationen in den **Keimzellen** oder Geschlechtszellen werden an die nächste Generation weitergegeben.

Es gibt viele verschiedene Formen von Mutationen, die genetische Vielfalt bewirken (Tabelle 8.5). Die häufigsten sind **Basenaustauschmutationen (Basenpaarsubstitutionen)**, bei denen ein Nucleotid durch ein anderes ersetzt ist. Wird eine Purinbase durch eine andere Purinbase ersetzt oder eine Pyrimidinbase durch eine Pyrimidinbase, so spricht man von einer **Transition**. Ist Pyrimidin hingegen gegen Purin ausgetauscht oder umgekehrt, liegt eine **Transversion** vor. Durch diese Mutationen entstehen SNPs, anhand derer man genomische Karten erstellen kann. Da verschiedene Personen etwa alle 1000 bis 2000 Basen eine Variation aufweisen, finden sich im gesamten Genom im Schnitt ungefähr 2,5 Millionen SNPs.

Tabelle 8.5 Mutationstypen

Basenveränderung	normal	mutiert
Transition	GA <u>A</u> CGT	GAG <u>C</u> GT
Transversion	GA <u>A</u> CGT	GAT <u>C</u> GT
Missense-Mutation	GA <u>A</u> CGT Glu Arg	GAT <u>I</u> CGT Asp Arg
konservative Substitution	<u>A</u> CT CGT Thr Arg	<u>I</u> CT CGT Ser Arg
Radikalsubstitution	GAT CGT Asp Arg	GCT CGT Ala Arg
Nonsense-Mutation	<u>G</u> AA CGT Glu Arg	<u>T</u> AA CGT Stopp
Insertion	GAACGT	GAA <u>A</u> CGT
Deletion	GAACGT	GACGT

SNPs oder Einzelbasensubstitutionen können überall im Genom vorkommen, sowohl in der codierenden als auch in der nichtcodierenden DNA. Tritt der SNP innerhalb eines Gens auf, kann sich die Sequenz und somit auch die Funktion des Proteins ändern. Wird durch den Austausch einer Base eine Aminosäure in dem Protein verändert, spricht man von einer **Missense-Mutation (Fehlsinnmutation)**. Einige Missense-Substitutionen wirken sich kaum auf die Struktur oder die Funktion des betreffenden Proteins aus, wenn eine Aminosäure etwa durch eine andere mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt wird. In diesem Fall spricht man von einer **konservativen Substitution**. Ein Beispiel wäre der Austausch von Threonin gegen Serin: Diese beiden Aminosäuren unterscheiden sich nur geringfügig in der Größe, aber nicht in der Chemie (beide haben eine –OH-Gruppe). **Radikalsubstitutionen** hingegen können die Funktion oder Struktur des Proteins verändern, weil hier Aminosäuren gegen andere mit abweichenden chemischen Eigenschaften ausgetauscht sind. So sind beispielsweise Asparaginsäure und Serin häufig an Wasserstoffbrücken beteiligt; wird eine davon jedoch durch eine neutrale Aminosäure wie Valin ersetzt, kann dies zur Instabilität der Proteinstruktur führen. Bisweilen führen Missense-Substitutionen zu sogenannten **konditionalen Mutationen**: Unter bestimmten Bedingungen funktioniert das Protein, unter anderen nicht. Eine häufige konditionale Mutation ist die **temperatursensitive Mutation**: Hierbei verändert die Mutation die Proteinfunktion bei der

permissiven Temperatur nicht, bei der restriktiven Temperatur ist das Protein hingegen defekt. Wird ein Codon durch einen Basenaustausch zu einem Stoppcodon, ergibt sich eine verstümmelte Version des Proteins. In diesem Fall spricht man von einer **Nonsense-Mutation (Nichtsinnmutation)**.

Neben Basenaustauschen können Mutationen auch zu **Insertionen** oder **Deletionen** führen. Wie beim Austausch einzelner Basen ist auch hierbei der Ort der Mutation entscheidend dafür, wie sich diese auswirkt. Erfolgt die Deletion oder Insertion einiger Basen innerhalb eines Gens, kann sich dadurch das Leseraster für das Protein verändern, wodurch nach der Mutation ein zufälliges Polypeptid entsteht. Häufig ergibt sich durch das veränderte Leseraster ein Stoppcodon, das zu einem verkürzten Protein führt. Durch große Deletionen können natürlich auch große Teile eines Gens oder gar gesamten Gene verloren gehen. Größere DNA-Abschnitte können durch **Inversionen**, **Translokationen** und **Duplikationen** Veränderungen erfahren. Bei einer Inversion wird ein DNA-Abschnitt in umgekehrter Orientierung wieder in die Originalsequenz eingefügt. Bei einer Translokation wird ein ganzer DNA-Abschnitt an eine andere Stelle verschoben, bei einer Duplikation wird der DNA-Abschnitt zunächst kopiert und erst danach an einer anderen Stelle eingefügt, wodurch zwei identische Regionen entstehen.

Bei einigen Bakterien erfolgen absichtlich reversible Inversionen und verursachen die sogenannte **Phasenvariation**. Hierbei wird durch ein Enzym namens **Invertase** (genaugenommen **DNA-Invertase**) ein an der Genregulation beteiligter DNA-Abschnitt invertiert. Dadurch ändert sich der Phänotyp der Bakterien. So werden beispielsweise bei *Salmonella* und *E. coli* durch Inversion eines Promotorabschnitts unterschiedliche Oberflächenantigenproteine an- oder abgeschaltet. In der einen Orientierung wird das Gen exprimiert, und das entsprechende Antigen erscheint auf der Zelloberfläche. In der anderen Orientierung zeigt der Promotor rückwärts zum Gen, das folglich auch nicht exprimiert wird. Dadurch können die Bakterien gegenüber dem menschlichen Immunsystem ihr Erscheinungsbild ändern, was eine Infektion erleichtert.

In erster Näherung treten Mutationen zufällig über das gesamte Genom verteilt auf. Es gibt jedoch sogenannte **Mutations-Hotspots** – Regionen, in denen Mutationen sehr viel häufiger auftreten. Vielfach erfolgen Mutationen an methylierten Sequenzen, weil bei methyliertem Cytosin häufig eine Aminogruppe eliminiert wird, wodurch ein Thy-

min entsteht. Gelegentlich kommt es zu Fehlern bei der Korrekturlesefunktion der Polymerase, und es werden einzelne falsche Basen eingebaut. Häufiger kommt es zu einer **Strangverschiebung**, wenn ein DNA-Abschnitt hochrepetitiv ist. Dies resultiert je nach Orientierung der Verschiebung in einer Duplikation oder Deletion.

Angeichts der Mutationsraten kann man besser verstehen, wie Mutationen den Verlauf der Evolution geprägt haben. Die Mutationsrate ist niedrig und hängt von dem jeweils betroffenen Organismus oder sogar von dem speziellen Gen ab. Dennoch treten im Laufe der Zeit zahlreiche Mutationen auf. Wie aus Tabelle 8.6 zu ersehen, ist die Mutationsrate in größeren Genomen weitaus niedriger. Bei *E. coli* treten innerhalb einer Generation Mutationen mit einer Häufigkeit von $5,4 \times 10^{-7}$ pro 1000 Basenpaare auf, beim Menschen hingegen mehr als zehnmal seltener mit nur $5,0 \times 10^{-8}$ pro 1000 Basenpaare. Korrigiert man jedoch die Mutationsrate in Hinblick auf die effektive Genomgröße (d.h. codierende Bereiche statt Gesamt-DNA), dann ist sie bei den meisten Organismen annähernd gleich. Das lässt darauf schließen, dass es einen Mechanismus geben muss, der die Mutationsrate aktiv steuert.

Mutationen treten bei allen Organismen mit ungefähr gleicher Rate an zufälligen Stellen im Genom auf.

Bei den Mutationen kann es sich um den Austausch einzelner Basen handeln oder um Inversionen, Deletionen oder Insertionen. Insertionen und Deletionen sind in der Länge variabel.

Genetische Evolution

Die Sequenzierung von Genomen hat die **molekulare Phylogenetik** enorm erweitert; darunter versteht man die Erforschung der evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse anhand von DNA- und Proteinsequenzen. Durch Vergleiche der Sequenzen verschiedener Organismen erhält man die Zahl der Veränderungen, die sich im Laufe von Millionen von Jahren angesammelt haben. Alle zellulären Organismen, einschließlich Bakterien, Pflanzen und Tiere, besitzen ribosomale RNA. Deren Sequenzen kann man vergleichen und anhand der Unterschiede den Verwandtschaftsgrad der Organismen ermitteln. Dieses Vorgehen ist weniger subjektiv als der Vergleich physischer Merkmale für die **Taxonomie**. Bei der als **Kladistik** bezeichneten Methode geht man davon aus, dass zwei Organismen letztendlich auf den gleichen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen (sofern man nur weit genug in der Entwicklungsgeschichte zurückgeht) und dass an irgendeiner Stelle der Abstammungslinie eine **dichotome Verzweigung** oder Aufgabelung in zwei **Kladen** (oder Monophyla) erfolgt ist. Die Unterschiede zwischen zwei Organismen geben an, vor wie langer Zeit diese Aufspaltung stattgefunden hat. Die taxonomische Einordnung kann auch anhand von sichtbaren Merkmalen – also des Phänotyps – erfolgen. Zumindest als erste Näherung funktioniert das bei Organismen mit zahlreichen auffälligen Merkmalen wie Säugetieren und Pflanzen recht gut. Bei Organismen wie Bakterien scheitert diese Methode allerdings. Die molekulare Phylogenetik hat jedoch

Tabelle 8.6 Mutationsraten in DNA-Genomen

Organismus	Genomgröße (Kilobasen)	Mutationsrate pro Generation		
		pro kb	pro Genom (unkorrigiert)	pro effektivem Genom
Bakteriophage M13	6,4	$7,2 \times 10^{-4}$	0,005	0,005
Bakteriophage Lambda	49	$7,7 \times 10^{-5}$	0,004	0,004
Escherichia coli	4600	$5,4 \times 10^{-7}$	0,003	0,003
Saccharomyces cerevisiae	12 000	$2,2 \times 10^{-7}$	0,003	0,003
Caenorhabditis elegans	80 000	$2,3 \times 10^{-7}$	0,018	0,004
Drosophila	170 000	$3,4 \times 10^{-7}$	0,058	0,005
Mensch	3 200 000	$5,0 \times 10^{-8}$	0,16	0,004

den Weg bereitet, um für alle Organismen Familienstammbäume zu erstellen.

Wenn man zur Erforschung des Verwandtschaftsgrades molekulare Daten verwendet, müssen die Sequenzen natürlich korrekt sein und auch wirklich von dem betreffenden Organismus stammen. Beim menschlichen Genom kann dies mitunter dadurch verkompliziert werden, dass einige Sequenzen von anderen Organismen wie Viren oder Bakterien stammen können. In gewissem Umfang betrifft dieses Problem alle Organismen. So enthalten beispielsweise viele Bakteriengenome eingebaute Genome von Bakteriophagen. Ebenso wichtig ist es, darauf zu achten, dass die verglichenen Sequenzen tatsächlich homolog sind, also alle von einer gemeinsamen Vorläufersequenz abstammen. Zum Vergleich der Sequenzen dient die Methode des **Sequenzalignments**; hierbei werden die Sequenzen nach den Regionen mit der größten Ähnlichkeit aneinander ausgerichtet (Abb. 8.13).

Durch diese Form des Sequenzalignments kann man die Verwandtschaft von zwei oder mehr Proteinen oder Genen ermitteln. Grafisch darstellen lässt sich der Verwandtschaftsgrad durch das Erstellen von **phylogenetischen Bäumen (Stammbäumen)**. Diese zeichnen sich durch mehrere Merkmale aus: Wurzel, Verzweigungspunkte und Äste (Abb. 8.14).

Die Wurzel steht für den gemeinsamen Vorfahren, die Verzweigung gibt die dichotomen Aufspaltungen im Laufe der Evolution wieder.

Einzelne Verzweigungspunkte stehen für gemeinsame Vorfahren zweier Untergruppen von Organismen. Die Äste repräsentieren Kladen, also monophyletische Gruppen, die auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen. Die Länge der Äste zeigt die Zahl der Sequenzänderungen an. Bei relativ kurzen Ästen ist die Aufspaltung der beiden Organismen erst vor relativ kurzer Zeit erfolgt, bei langen Ästen liegt sie schon länger zurück.

Anhand von Sequenzalignments hat man Gene in **Genfamilien** eingeteilt, Gruppen nahe verwandter Gene, die durch sukzessive Duplikation und Divergenz entstanden sind. **Gensuperfamilien** entstehen, wenn sich die Funktionen der verschiedenen Gene stetig auseinanderentwickelt haben, bis einige kaum noch erkennbar sind. Die Gene ähneln einander dann zwar noch in der Struktur, erfüllen aber sehr unterschiedliche Funktionen. So umfasst beispielsweise die Superfamilie der Transporter viele Proteine, die den Transport von Molekülen über biologische Membranen ermöglichen. Mitglieder dieser Superfamilie transportieren Zucker in Bakterien, Wasser in menschliche Zellen oder sogar Antibiotika aus Bakterien hinaus. Man findet sie

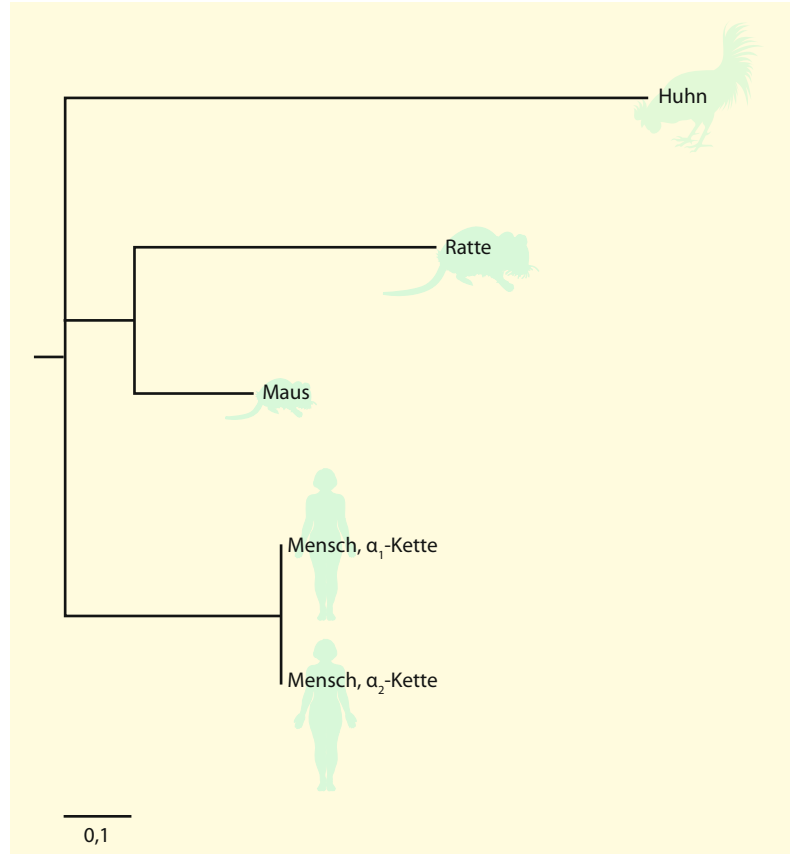
Human alpha 1	MVLSPADKTNVKAAGKVGGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLS	50
Human alpha 2	MVLSPADKTNVKAAGKVGGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLS	50
Rat alpha 1	MVLSADDKTNIKNCWGKIGGGGGEYGEALQRMFAAFPTTKTYFPHFDLS	50
Mouse alpha 1	MVLSGEDKSNIAAGKIGGGGAEGYGAELERMFAAFPTTKTYFPHFDLS	50
Chicken alpha-A	MVLSAADKNNVKGIFTKIAGHAEEYGAETLERMFTTYPPTTKTYFPHFDLS	50
	**** *.**.* : :*.**.* ** **::*** :*.*****.*:.*	
Human alpha 1	HGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFK	100
Human alpha 2	HGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFK	100
Rat alpha 1	PGSAQVKAHGKKVADALAKAADHVEDLPGALSTLSDLHAHKLRVDPVNFK	100
Mouse alpha 1	HGSAQVKGHGKKVADALASAAGHLDDLPGALSALSDLHAHKLRVDPVNFK	100
Chicken alpha-A	HGSAQIKGHGKKVVAALIEAANHIDDIAGTSLKLSDLHAHKLRVDPVNFK	100
	****.*.*****. ** .*. :*:..:.* *****	
Human alpha 1	LLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	142
Human alpha 2	LLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	142
Rat alpha 1	FLSHCLLVTLACHHPGDFTPAMHASLDKFLASVSTVLTSKYR	142
Mouse alpha 1	LLSHCLLVTLASHHPADFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	142
Chicken alpha-A	LLGQCFLVVVAIHHPAALTPEVHASLDKFLCAVGTVLTAKYR	142
	:*.:*:*.*.* * * . :** :*****.:*.*.*:***	

8.13 Sequenzalignment verwandter Hämoglobinsequenzen

Die Hämoglobinsequenzen wurden mit dem Sequenzalignment-Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) aneinander ausgerichtet. Mit einem Sternchen (*) markierte Aminosäuren sind in allen Sequenzen identisch. Die mit einem Doppelpunkt (:) oder Punkt (.) markierten sind zwar nicht identisch, aber der Aminosäuretyp ist konserviert.

8.14 Phylogenetischer Baum von Hämoglobin

Verglichen wurden folgende Aminosäuresequenzen: Globin-A des Huhnes, α_1 -Kette der Ratte, α_1 -Kette der Maus sowie α_1 - und α_2 -Kette des Menschen. Die Länge der Linien repräsentiert die Zahl der Sequenzunterschiede: Je länger die Linie ist, desto mehr Abweichungen in der Sequenz gibt es. Die Unterschiede wurden mit dem Programm ClustalW analysiert und der Baum mit dem Programm Phylodendron (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>) gezeichnet.



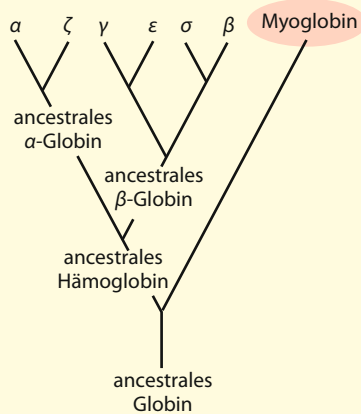
bei fast allen Organismen. Eine weitere Gensuperfamilie ist die Globinfamilie (Abb. 8.15). Zu dieser Familie gehören die Myoglobine und Hämoglobine. All diese Proteine transportieren an Eisen gebundenen Sauerstoff; Myoglobin ist jedoch spezifisch für Muskelzellen, Hämoglobin hingegen für Blut. Man geht davon aus, dass zu einem frühen Zeitpunkt in der Evolution nur ein Gen für ein ancestrales Globin existierte. Irgendwann wurde dieses Gen dupliziert, und die Kopien haben sich getrennt entwickelt, sodass sich die eine auf das Blut, die andere auf die Muskeln spezialisiert hat. Hämoglobin selbst hat sich also erst später in verschiedene Formen aufgespalten, die jeweils in verschiedenen Entwicklungsstadien aktiv werden.

Neue Gene können jeweils einzeln entstehen, daneben können jedoch auch ganze Chromosomen oder Genome dupliziert werden. Bei einigen Organismen, insbesondere Pflanzen, sind Duplikationen des gesamten Genoms relativ stabil und kommen recht häufig vor, beispielsweise beim heutigen Wei-

zen. Er stammt von einer typischen diploiden Pflanze ab, der heute zur Herstellung von Mehl verwendete Weizen ist jedoch tetraploid. Der für Nudeln verwendete Hartweizen ist hexaploid und stammt von drei verschiedenen Vorläuferpflanzen ab. Diese Sorten entstanden durch natürliche Mutation und wurden aufgrund ihres höheren Proteingehalts und des besseren Ertrags zu Nutzpflanzen.

Die Mutationsrate verschiedener Gene kann stark variieren. Das menschliche Genom unterliegt zwar einer stetigen durchschnittlichen Mutationsrate, einzelne Gene mutieren jedoch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Essenzielle Proteine evolvieren oder mutieren im Schnitt langsamer. Es gilt aber auch umgekehrt: Je weniger entscheidend ein Gen für das Überleben ist, desto mehr Mutationen können toleriert werden und desto schneller evolviert das Protein. So sind beispielsweise im Gen für Cytochrom c, einem wesentlichen Bestandteil der Elektronentransportkette, in 100 Millionen Jahren im Schnitt nur 6,7 Veränderungen pro 100 Aminosäuren

Stammbaum der Globingenfamilie



8.15 Die Globingenfamilie

Im Laufe der Evolution ist durch verschiedene Genduplikationen und Aufspaltungsereignisse eine Familie nahe verwandter Gene entstanden. Nach der Duplikation des ersten ancestralen Globingens entstanden Hämoglobin und Myoglobin. Nach einer weiteren Duplikation hat sich das Hämoglobin in ein ancestrales α -Globin- und ein ancestrales β -Globin aufgespalten. Weitere Duplikationen und Aufspaltungen brachten die gesamte Familie der Globingene hervor.

erfolgt. Im Gegensatz dazu haben sich bei den Fibrinopeptiden, die an der Blutgerinnung beteiligt sind, im gleichen Zeitraum 91 Mutationen pro 100 Aminosäuren angehäuft. Wie bereits erwähnt, eignet sich die ribosomale RNA gut, um Stammbäume entfernt verwandter Arten zu erstellen. Man findet sie in allen Organismen, sie ist wichtig für das Überleben und evolviert daher langsam.

Was passiert, wenn ein Wissenschaftler nahe verwandte Organismen klassifizieren möchte? Essenzielle Gensequenzen liefern nicht genügend genetische Variabilität, um solche Organismen auseinanderzuhalten. Die Lösung könnten nichtessenzielle Gene darstellen, aber häufig sind auch diese zu ähnlich. In solchen Fällen kann man die Wobble-Position codierender oder sogar nichtcodierender Abschnitte verwenden. Wie in Kapitel 2 ausgeführt, bezeichnet man als Wobble-Position das Nucleotid an der dritten Stelle eines Codons. Oft wird die gleiche Aminosäure durch verschiedene Codons codiert, die sich nur in dieser dritten Base unterscheiden. Daher wirken sich Änderungen an dieser Position in der Regel nicht auf

die Funktion oder die Struktur des Proteins aus und können bei sehr nahe verwandten Arten oder auch bei Individuen derselben Art auftreten.

Um den Verwandtschaftsgrad von Organismen festzustellen, vergleicht man auch die Genome der Mitochondrien und Chloroplasten. Hier sammeln sich mit höherer Rate Mutationen an als im Kerngenom. Die Organellengenome variieren insbesondere in den nichtcodierenden Regionen. Ein Nachteil der Verwendung von Organellengenomen ist, dass Mitochondrien und Chloroplasten nur von der Mutter vererbt werden und sich damit nur die Abstammungslinie der mütterlichen Seite nachvollziehen lässt.

Die molekulare Phylogenetik stellt anhand von Sequenzen aus dem Genom verschiedener Organismen deren evolutionäre Verwandtschaftsverhältnisse fest.

Bei essenziellen Proteinen sammeln sich mit der Zeit weniger Mutationen an, bei weniger essenziellen Proteinen treten mehr Mutationen auf.

Von der Pharmakologie zur Pharmakogenetik

Ein weiteres Forschungsgebiet, das durch das Humangenomprojekt zahlreiche Veränderungen erfahren hat, ist die Pharmakologie – die Entwicklung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krankheiten. Die Entwicklung von Arzneimitteln fand seit jeher „auf gut Glück“ statt – oft wurden neue Arzneistoffe als Nebenprodukt anderer Forschungen entdeckt. Penicillin zählt zu den größten Entdeckungen des 20. Jahrhunderts, wurde jedoch nur durch Zufall gefunden. Alexander Fleming kultivierte Bakterien der Gattung *Staphylococcus* und ließ die Platten während der Ferien stehen. Nach seiner Rückkehr waren die Platten von Schimmelpilzen kontaminiert. Seltsamerweise wuchsen aber in der Umgebung des Schimmels keine Staphylokokken. Offenbar gab der Schimmelpilz eine Substanz ab, die das Bakterienwachstum unterband.

Selbst Viagra wurde per Zufall entdeckt. Die Wissenschaftler wollten eigentlich ein Herzmedikament entwickeln, als sie die „Nebenwirkung“ bemerkten. Die Entwicklung von Medikamenten ist unter anderem deswegen so kostspielig, weil viele der gewählten Forschungswege in Sackgassen führen.

Ein weiteres Problem bei der Entwicklung von Arzneimitteln sind die **Nebenwirkungen**, auch als **unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW)** bezeichnet. Während bei manchen Patienten solche unerwünschten Nebenwirkungen auftreten, reagieren andere auf dasselbe Arzneimittel gut und können geheilt werden. Die meisten Medikamente werden für den Durchschnittspatienten entwickelt, es gibt jedoch immer einige Menschen, bei denen es zu unerwünschten Wirkungen kommt. So reagieren beispielsweise viele Menschen allergisch auf Penicillin oder andere Antibiotika. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen gehören zu den Hauptursachen für Klinikaufenthalte und Todesfälle infolge von Medikamenteneinnahme. Häufig sind die unterschiedlichen Reaktionen der Betroffenen auf bestimmte Arzneimittel genetisch bedingt.

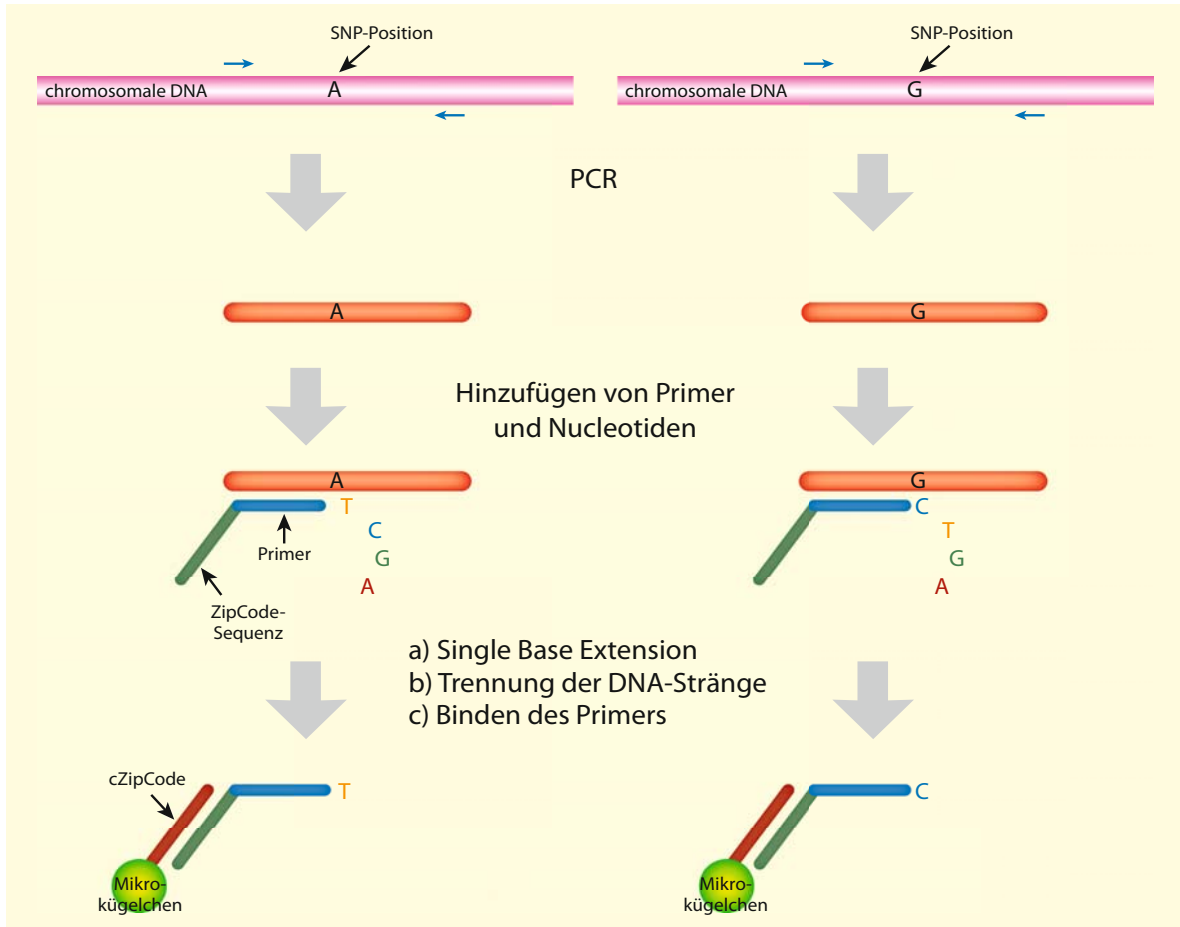
Die **Pharmakogenomik** befasst sich mit der Erforschung sämtlicher Gene im Zusammenhang mit der Reaktion auf Arzneimittel beim Menschen. In der **Pharmakogenetik** werden spezifisch vererbte Unterschiede im Metabolismus und in der Reaktion auf Arzneimittel erforscht. Beide Forschungsgebiete haben zum Ziel, die Zahl der unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu verringern. Dazu wird vor Verabreichung eines bestimmten Medikaments zunächst die genetische Ausstattung des Patienten ermittelt. Entscheidend für solche „genetischen“ Diagnosen sind SNPs (s. weiter vorne). Häufig können einzelne Austausche in codierenden Regionen mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen in Verbindung gebracht werden. Wenn beispielsweise ein bestimmter Teil der Bevölkerung nicht auf ein Arzneimittel reagiert, kann man die DNA dieser Menschen daraufhin analysieren, ob ein bestimmter SNP vorhanden ist, den Patienten, die eine Reaktion zeigen, nicht aufweisen. Bevor man einem neuen Patienten ebenfalls dieses Medikament verabreicht, kann zuerst die DNA einer Blutprobe auf das Vorhandensein dieses SNP getestet werden. Die Tests auf SNPs können in einer Arztpraxis mittels Microarrays (s. weiter unten) erfolgen. Auf diese Weise lässt sich die Zahl der Praxisbesuche oder Krankenhausaufenthalte verringern.

Mittels SNP-Analysen kann man auch Screenings auf Erbdefekte durchführen. Die SNPs werden mit einer als „ZipCode-Analyse“ bezeichneten Methode spezifisch nachgewiesen (Abb. 8.16). Die Methode erlaubt die gleichzeitige Analyse vieler verschiedener SNPs. Zunächst amplifiziert man mittels PCR die Region, welche die verschiedenen zu untersuchenden SNPs enthält. Man könnte die PCR-Fragmente

vollständig sequenzieren, da sich die SNPs aber nur in einer einzigen Base unterscheiden, führt man eine sogenannte Single Base Extension (SBE) durch. Dafür wird ein Primer zugesetzt, der sich nur eine einzige Base vom SNP entfernt anlagert. Dieser Primer enthält auch eine „ZipCode-Region“, mit der dieser spezifische SNP analysiert werden kann; jeder SNP hat einen anderen ZipCode. Nachdem sich der ZipCode-Primer an die PCR-Fragmente angelagert hat, werden DNA-Polymerase und fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide hinzugefügt. Dadurch wird der Primer nur um eine einzelne Base verlängert. (Man beachte, dass Didesoxynucleotide die Kettenverlängerung blockieren und daher nur eine Base zugefügt werden kann.) Jede Base wird mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert und kann so identifiziert werden. Anschließend werden Mikrokügelchen hinzugegeben, an die komplementäre ZipCode-Sequenzen (cZipCode) gebunden sind. Diese erkennen den ZipCode des Primers. Der gebundene ZipCode-Primer mit dem markierten Nucleotid hat abhängig von der eingebauten Base eine andere Farbe. Die verschiedenen Farben können dann mittels Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescent activated cell sorting*) sortiert und ausgezählt werden.

Als Nebenprodukt des Humangenomprojekts entstand unter anderem die Datenbank Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB; <http://www.pharmgkb.org/>). Darin sind sämtliche Gene und Mutationen verzeichnet, welche die Wirkung von Arzneimitteln beeinflussen. Man denke nur an Asthma. Bei dieser Krankheit kommt es aufgrund einer Überempfindlichkeit gegenüber eingeatmeten Reizstoffen zu einer Verengung der Atemwege. Die Muskelzellen um die Bronchien verkrampfen sich und behindern so den Luftstrom. Zur Erweiterung der Atemwege bei Asthmapatienten wird das Medikament Albuterol eingesetzt. Dieses wirkt entspannend auf die Muskelzellen und erweitert dadurch die Bronchien. Albuterol wirkt auf den β -2-adrenergen Rezeptor, und durch Mutationen in diesem Rezeptor verändert sich die Wirksamkeit von Albuterol. Durch den Austausch nur eines einzigen Nucleotids, das Ersetzen von Glycin an Position 16 durch Arginin, erhält man ein Rezeptorprotein, das effektiver auf Albuterol reagiert. Ob Albuterol wirkt, hängt somit davon ab, ob ein Patient diesen SNP aufweist.

Eines weiteres wichtiges Gebiet der Pharmakogenetik betrifft die Cytochrom-P450-Enzymfamilie. Diese spielt eine entscheidende Rolle beim oxidativen Abbau zahlreicher Fremdmoleküle, darunter



8.16 ZipCode-Analyse und Single Base Extension (SBE) von SNPs

Mittels PCR wird ein DNA-Abschnitt mit einem SNP erzeugt (hier ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ein einzelner Strang dargestellt). Anschließend wird mit einem Primer, der eine Base vor dem SNP bindet, eine Single Base Extension durchgeführt. Person 1 hat an der Stelle des SNP ein A, daher wird ddT eingebaut. Bei Person 2 führt ein G an derselben Stelle zum Einbau von ddC. Die Basen werden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Durch die Verwendung von Didesoxynucleotiden wird die Addition weiterer Basen verhindert. Der verlängerte Primer bindet dann über seine ZipCode-Sequenz an den komplementären cZipCode, der zur einfacheren Isolierung an ein Mikrokügelchen oder einen anderen festen Träger gebunden ist.

auch viele Pharmazeutika. Das Isoenzym CYP2D6 oxidiert Arzneimittel aus der Klasse der trizyklischen Antidepressiva; die verschiedenen Allele dieses Enzyms beeinflussen, wie gut der Betreffende diese Arzneimittel verstoffwechseln kann. Ähnlich wie bei Albuterol kann man feststellen, welches Allel ein Patient besitzt, und dadurch eine Überdosierung oder abträgliche Reaktionen vermeiden. Mit der Zeit werden immer mehr medizinische Behandlungen individuell auf den Patienten abgestimmt sein und nicht auf eine Durchschnittsperson.

Die Pharmakogenetik befasst sich mit vererbten Unterschieden im Stoffwechsel und der Reaktion auf Arzneimittel.

Einige SNPs wirken sich darauf aus, wie der Betreffende ein bestimmtes Arzneimittel verstoffwechselt. Wenn man ermittelt hat, welcher SNP mit welcher Arzneimittelsensitivität in Verbindung steht, kann man Patienten vor Verabreichung eines Medikaments daraufhin testen und damit möglicherweise unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) vermeiden.

Genexpression und Microarrays

Wie bereits erwähnt, besteht eines der größten Probleme bei der Ermittlung der korrekten Anzahl von Genen darin, zu entscheiden, ob es sich bei einer bestimmten Sequenz tatsächlich um ein Gen handelt oder nicht. Um festzustellen, ob ein vermeintliches Gen tatsächlich eines ist, kann man als ersten Schritt messen, ob ein Gen in mRNA transkribiert wird. Lange Zeit hat man die Genexpression auf der Basis einzelner Gene gemessen, mittlerweile untersucht die **funktionelle Genomik** die Genexpression jedoch am gesamten Genom. Die funktionelle Genomik beinhaltet die umfassende Analyse der gesamten vom Genom transkribierten RNA – bezeichnet als **Transkriptom**; sämtliche vom Genom codierten Proteine – das **Proteom** (s. Kap. 9); sowie alle in dem Organismus ablaufenden Stoffwechselwege – das **Metabolom** (s. Kap. 9).

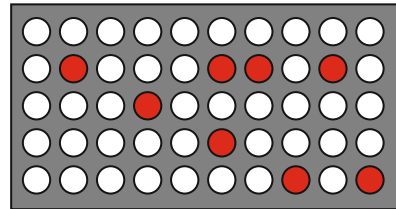
Da das gesamte menschliche Genom lediglich rund 25 000 verschiedene Gene umfasst, kann man die Genexpression mithilfe der Microarray-Technik erforschen. **DNA-Microarrays** oder **DNA-Chips** sind auf einem festen Trägermaterial wie einem Objektträger mit Tausenden unterschiedlichen einzigartigen Sequenzen beschichtet. Microarrays beruhen auf dem Prinzip der Hybridisierung einer „Sonde“ mit Zielmolekülen in der experimentellen Probe. In dem Microarray sind die Sonden jedoch an den festen Träger gebunden, und die Probe befindet sich in Lösung. Der Microarray repräsentiert das Genom des zu testenden Organismus; die Sequenzen entsprechen dessen einzelnen Genen.

Zur Analyse der Genexpression wird RNA aus einer Zellprobe extrahiert und gegen den Microarray getestet. Normalerweise wird die zu analysierende RNA-Probe zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Hybridisierung der mRNA aus der Probe mit den DNA-Sonden auf dem Träger zeigt an, ob und in welchem Umfang ein Gen exprimiert wird. Die Fluoreszenz an den einzelnen Punkten des Arrays korreliert mit der Menge der entsprechenden mRNA in der Probe.

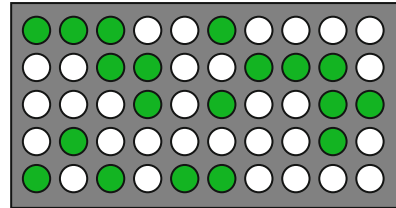
Mit Microarrays kann man RNA aus Zellen hybridisieren, die unter den verschiedensten Versuchsbedingungen kultiviert wurden – zum Beispiel Hitzeschock, Krebs oder andere Krankheitszustände. Denselben Array kann man mit zwei oder mehr RNA-Proben hybridisieren (Versuchs- und Kontrollproben) und so die Genexpression vergleichen.

Für diesen Vergleich markiert man jede RNA-Probe mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff, etwa rot und grün. Ist eine bestimmte RNA in nur einer der Proben vorhanden, wird der entsprechende Punkt auf dem Microarray rot oder grün leuchten (Abb. 8.17); ist die betreffende RNA jedoch sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollprobe enthalten, so wird der Punkt gelb leuchten (d.h. rot plus grün). Moderne Arrays können Tausende oder gar Millionen verschiedene Proben aufnehmen, sodass man damit das gesamte Genom der meisten

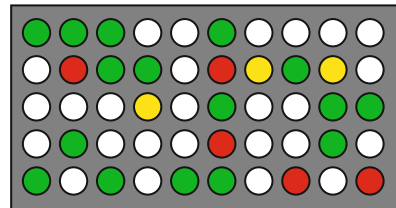
Array mit RNA aus Zellen, die unter Bedingung 1 kultiviert wurden, angefärbt mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff



Array mit RNA aus Zellen, die unter Bedingung 2 kultiviert wurden, angefärbt mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff



Array mit RNA aus beiden Proben; die gelben Punkte zeigen Gene an, die unter beiden Bedingungen exprimiert werden



8.17 Nachweis von mRNA durch Fluoreszenzfarbstoffe mit einem DNA-Chip

DNA-Chips können viele verschiedene mRNAs gleichzeitig nachweisen. Jeder Punkt des Rasters ist an eine andere DNA-Sequenz gebunden. Um festzustellen, welche Gene unter welchen Bedingungen exprimiert werden, isoliert man mRNA und markiert jede Probe mit einem andersfarbigen Fluoreszenzfarbstoff. Bei Verwendung zweier verschiedener Farbstoffe (wie im gezeigten Beispiel) kann der gleiche Chip für beide verwendet werden. Die Visualisierung erfolgt dann auf drei verschiedene Weisen: Eine zeigt nur den roten Farbstoff, eine zweite nur den grünen; bei der dritten werden die beiden Bilder übereinandergelegt, sodass die überlappenden Punkte gelb leuchten.

Organismen auf einmal testen kann. Manche Arrays sind so gruppiert, dass alle an der Proteinsynthese beteiligten Gene oder alle an der Hitzeschockreaktion beteiligten beieinander liegen. Per Computer werden Farbe und Intensität der Fluoreszenz für jeden der Punkte abgelesen und das Ergebnis analysiert.

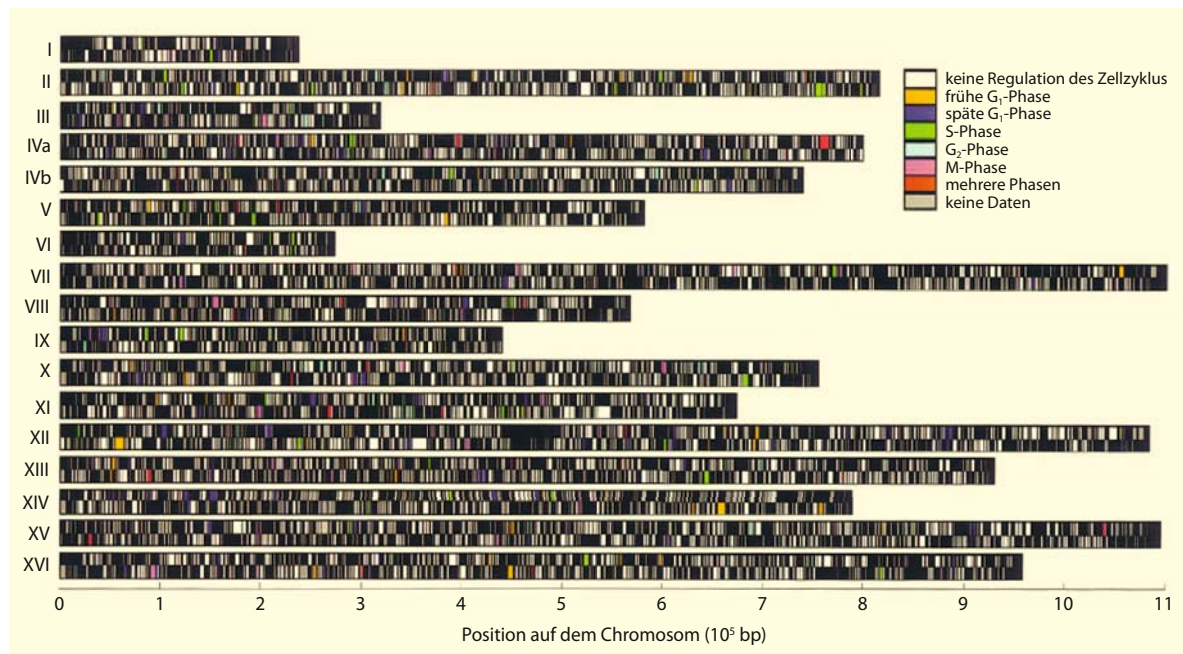
Die Ergebnisse können einen umfassenden Einblick in die Genexpression unter verschiedenen Versuchsbedingungen geben. Mit dieser äußerst effektiven Technik sind Wissenschaftler in der Lage Tausende oder gar Millionen Sequenzen auf einmal zu analysieren. So kann man beispielsweise Träger mit jedem benannten Gen des Hefegenoms herstellen und diese Gene auf ihre Expression in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus analysieren. Eine Hefekultur kann durch Zugabe von α -Faktor oder die Verwendung einer mutierten Hefe (die in bestimmten Mitosestadien stoppt) synchronisiert und in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus angehalten werden. So ist es möglich, die Genexpressionsmuster der jeweiligen Stadien zusammenzustellen und zu vergleichen (Abb. 8.18).

Die funktionelle Genomik beinhaltet die umfassende Analyse der gesamten vom Genom transkribierten RNA.

DNA-Microarrays oder DNA-Chips bestehen aus einem festen Träger (z.B. aus Glas), der mit Tausenden verschiedenen einzigartigen Sequenzen beschichtet ist. Wird auf dem Microarray fluoreszenzmarkierte RNA inkubiert, kommt es zur Hybridisierung komplementärer Sequenzen. Die Intensität der Fluoreszenz entspricht der Menge an RNA, die an den DNA-Microarray gebunden ist.

Herstellung von DNA-Microarrays

Es gibt vor allem zwei Typen von DNA-Microarrays: Der eine enthält cDNA-Fragmente von 600 bis 2400 Nucleotiden Länge, der andere 20 bis 50 Nucleotide lange Oligonucleotide. Jeder dieser Typen wird anders hergestellt. Bei der Herstellung eines cDNA-Mi-



8.18 Genexpression während des Zellzyklus der Hefe

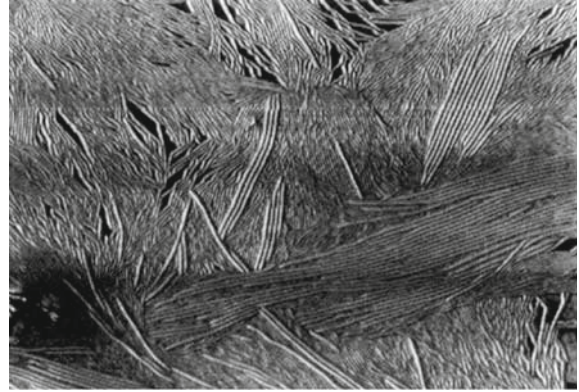
Die Farbcodierung zeigt die Phase des Zellzyklus mit der maximalen Genexpression an. Auf den 16 Chromosomen der Hefe wurden mehr als 800 verschiedene Gene analysiert, die auf Veränderungen des Zellzyklus reagieren. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung aus Cho et al (1998) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* 2: 65-73.

croarrays muss man jede der verschiedenen Sonden einzeln auswählen und durch PCR oder herkömmliches Klonen erzeugen. Danach werden alle DNA-Sonden auf den Träger gespottet. Zur Herstellung eines Oligonucleotid-Arrays wird das Oligonucleotid direkt auf dem Träger synthetisiert.

cDNA-Microarrays

Als ersten Schritt bei der Herstellung eines cDNA-Microarrays muss man Zahl und Typ der Sonden ermitteln, die an den Träger gebunden werden sollen. Da bei verschiedenen Organismen schon das gesamte Genom sequenziert wurde, ist es relativ einfach, potenzielle Gene zu identifizieren. Bei der Sequenzierung dieser Genome entstehen viele geklonte DNA-Abschnitte, die alle verschiedenen Gene oder einen Teil davon enthalten. Die Wissenschaftler können entweder diese Klone verwenden oder mithilfe der PCR Gene aus einer DNA-Probe amplifizieren. Vor dem Aufbringen auf den Glasträger muss jedes PCR-Produkt zunächst gereinigt werden, damit überflüssige Nucleotide, *Taq*-Polymerase und Salze beseitigt werden und nur die reine DNA an den Träger bindet. Reine cDNA-Proben kann man direkt verwenden.

Im nächsten Schritt wird mithilfe eines Microarray-Roboters der Chip hergestellt. In Vertiefungen (*wells*), die rasterförmig auf Mikrotiterplatten angeordnet sind, gibt man die gereinigten DNA-Proben. Die Größe des Rasters hängt von der Zahl der Proben ab. Wenn jedes vorhergesagte menschliche Gen einmal vorhanden ist, benötigt man ungefähr 25 000 Vertiefungen. In der Praxis werden Sonden für jedes Gen mehr als einmal an verschiedenen Stellen des Chips gebunden; damit erhält man für jedes Gen mehrere Messwerte. Mit einem Roboterarm werden rasterförmig angeordnete, sogenannte Pins in die Vertiefungen getaucht – jeweils ein Pin pro Vertiefung. Anschließend kommen die Spitzen mit einem Glasträger in Kontakt und hinterlassen jeweils einen kleinen DNA-Tropfen. Der Roboterarm stellt so lange gespottete Glasträger her, bis die DNA in den Wells aufgebraucht ist. Durch die Verwendung des Microarray-Roboters sind die einzelnen Chips preisgünstig und einfach herzustellen. Schließlich wird die DNA mithilfe von ultravioletter Licht mit dem Glasträger vernetzt; dabei bilden sich zwischen den Thyminen der DNA und dem Glas Quervernetzungen aus. Abbildung 8.19 zeigt die DNA auf einem Microarray-Raster, sichtbar gemacht durch ein Rasterkraftmikroskop (RKM).



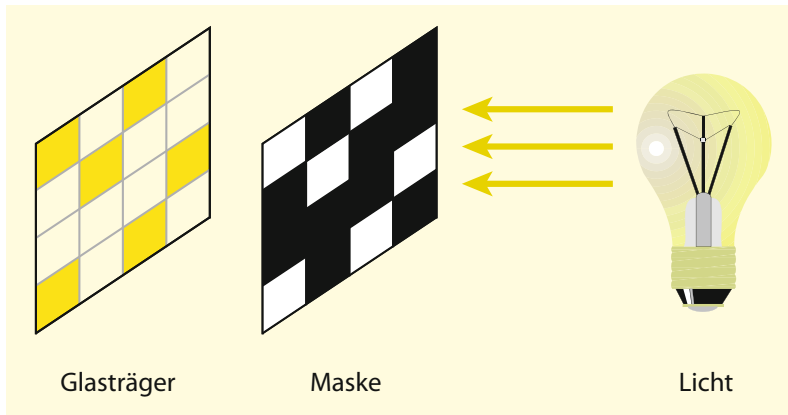
8.19 Rasterkraftmikroskopisches Bild der DNA auf einem Microarray

Bereich eines Hefe-Microarrays nach der Hybridisierung. Die DNA ist deutlich in ausreichender Dichte aufgebracht, um viele Wechselwirkungen zwischen Strängen zu ermöglichen. Die Breite der Abbildung entspricht einer Entfernung von zwei Mikrometern. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. aus Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM, *Nature Genetics* 12: 82–89, Copyright 1999.

Mit den inzwischen entwickelten neueren Technologien lassen sich die Größenschwankungen der Probenspots in den Microarrays verringern. Bei neueren cDNA-Microarrays werden die Proben mit einer Tintenstrahldruckertechnik auf den Glasträger aufgetragen. Dazu werden die cDNA-Proben vom Druckkopf in separate Kammern aufgesogen und dann in Tröpfchen auf den Glasträger aufgebracht, ähnlich einem Drucker, der Papier mit Tinte bedruckt. Durch diese Drucktechnologie kann man Größen- und Mengenschwankungen der cDNA in den Probenspots verhindern. Durch spezielle Anschlussstücke wird verhindert, dass es zu einer Vermischung der Tintenkanäle und damit zu einer gegenseitigen Kontamination kommt.

Oligonucleotid-Microarrays

Traditionell werden Oligonucleotide an Kugeln aus porösem Glas (engl. *controlled pore glass*, CPG; s. Kap. 4) chemisch synthetisiert. Daher ist es kein allzu großer logischer Sprung, viele verschiedene Oligonucleotide nebeneinander auf einem Glasträger zu synthetisieren. Der Hauptunterschied zwischen der Synthese einzelner Nucleotide auf Kugeln und der Herstellung von Arrays auf Glasträgern ist, dass der



8.20 Photolithographie

Durch eine Maske strahlendes Licht erzeugt auf dem Glasträger ein bestimmtes Muster. Ist der Träger mit einer Substanz beschichtet, die durch Licht aktiviert wird, werden nur die beleuchteten Bereiche für die Anlagerung eines weiteren Nucleotids aktiviert.

Array aus Tausenden verschiedenen Oligonucleotiden besteht, von denen jedes an der richtigen Stelle mit einer einzigartigen Sequenz synthetisiert werden muss. Dazu kombiniert man die **Photolithographie** und die Festphasen-DNA-Synthese (Abb. 8.20). Die Technik der Photolithographie wird zur Herstellung von integrierten Schaltkreisen verwendet, wobei mittels einer Maske bestimmte Lichtmuster auf eine feste Oberfläche übertragen werden. Das Licht aktiviert die Oberfläche, auf die es trifft, während die übrige Oberfläche inaktiviert bleibt.

Zunächst wird ein Objektträger mit einem Spacer beschichtet, der in einer reaktiven Gruppe endet. Diese wird dann mit einer lichtsensitiven Blockierungsgruppe beschichtet, die durch Licht entfernt werden kann. Bei jedem Syntheszyklus werden jene Stellen, an denen ein bestimmtes Nucleotid binden soll, beleuchtet, um die Blockierungsgruppe zu entfernen. Dann werden nacheinander die vier Nucleotide zugegeben. Nach jedem Mal wird eine Maske an dem Glasträger ausgerichtet. Durch Löcher in der Maske strahlt Licht und aktiviert die Enden jener wachsenden Oligonucleotidketten, die beleuchtet werden. Ganz ähnlich wie bei der traditionellen chemischen Synthese ist das 5'-OH-Ende jedes Nucleotids geschützt. Somit wird nach jeder Zugabe das Ende der wachsenden Kette erneut blockiert. Diese Schutzgruppen werden durch Licht aktiviert. Deshalb wird bei jedem Schritt eine neue Maske vor dem Glasträger platziert, und durchscheinendes Licht entfernt die Schutzgruppen von den betreffenden Nucleotiden. Dieser gesamte Vorgang wiederholt sich für jedes Nucleotid an jeder Position auf dem Glasträger. Entscheidend für diese Technologie ist die Herstellung der Masken (Abb. 8.21).

DNA-Microarrays werden mit cDNA oder Oligonucleotiden hergestellt.

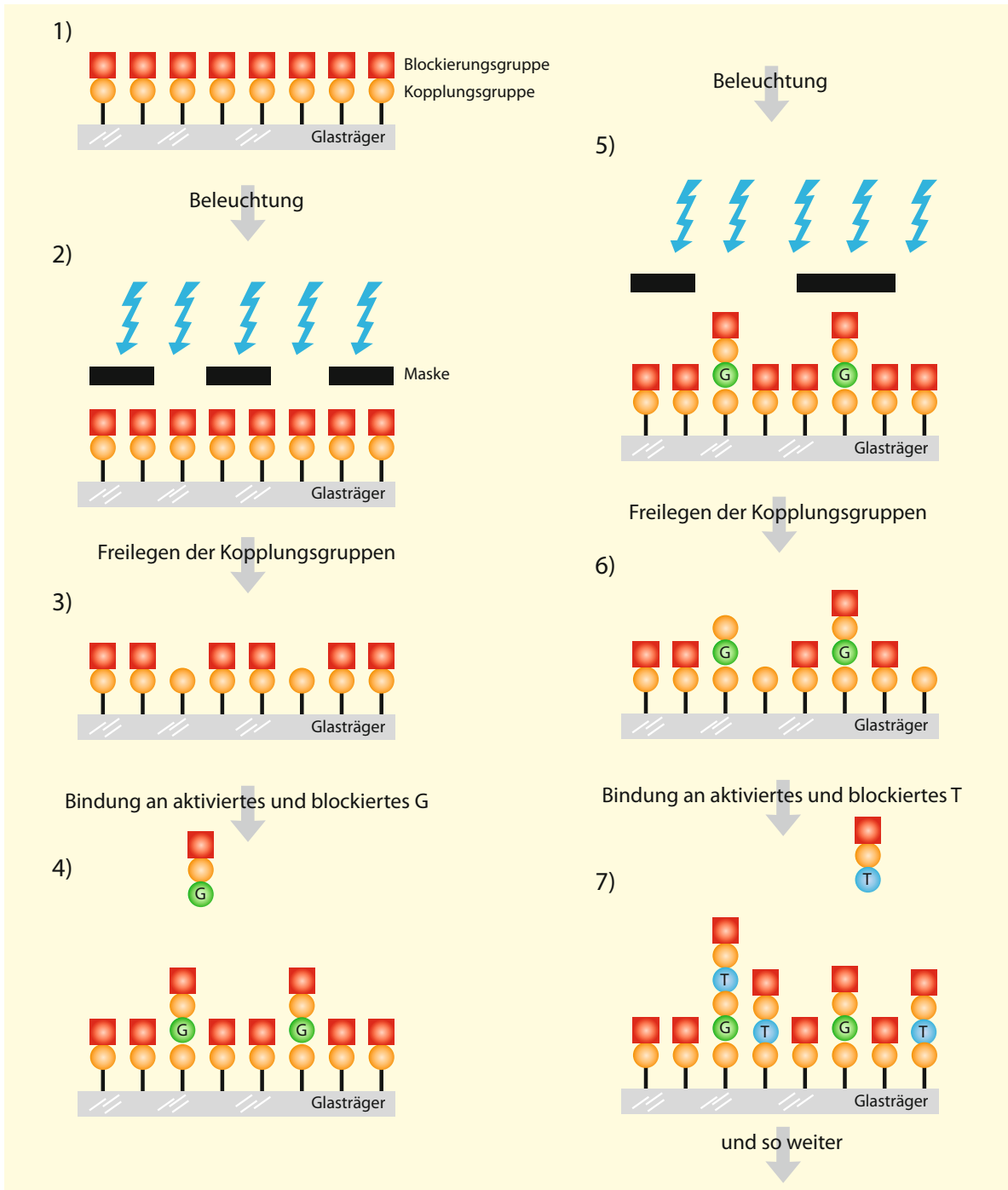
Zur Herstellung der Microarrays werden Proben reiner cDNA-Klone in kleinen Spots auf Glasträger aufgetragen. Die DNA wird mittels UV-Bestrahlung mit dem Glas quervernetzt.

Bei der Herstellung von Oligonucleotid-Arrays wird die DNA direkt auf dem Objektträger synthetisiert.

Hybridisierung auf DNA-Microarrays

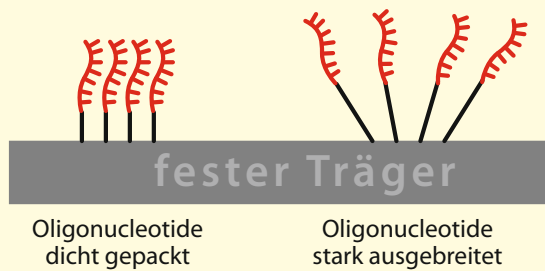
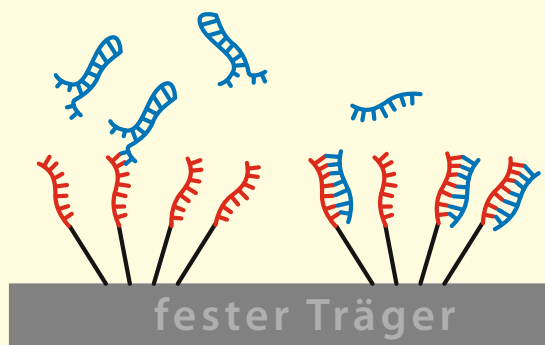
Die Hybridisierung der DNA auf einem Microarray ähnelt der anderer Hybridisierungen wie Southern Blots, Northern Blots oder Western Blots. All diese Techniken beruhen auf der komplementären Natur der beiden DNA-Stränge. Kommen zwei komplementäre DNA-Stränge zusammen, so lagern sich die komplementären Basen aneinander, also Thymin an Adenin und Guanin an Cytosin. Die Hybridisierung bei einem DNA-Microarray wird durch die gleichen Faktoren beeinflusst wie bei diesen Techniken.

Die Bindung der DNA an den Objektträger kann sich darauf auswirken, wie gut die DNA-Sonde mit der Ziel-DNA hybridisiert. Das gilt insbesondere für Oligonucleotid-Microarrays (Abb. 8.22). Durch die Länge der Spacermoleküle zwischen den Oligonucleotiden und dem Glasträger lässt sich die Hybridisierung optimieren. Bei einem Oligonucleotid, das mit einem kurzen Spacer an das Glas gebunden ist, befinden sich viele der Nucleotide am Anfang der Sequenz zu nahe am Objektträger, sodass sich die



8.21 Oligonucleotidsynthese direkt auf dem Chip

Zur Herstellung von Oligonucleotid-Arrays kann die chemische Synthese der Oligonucleotide direkt auf dem Chip erfolgen. Zunächst werden Spacer mit reaktiven Gruppen an den Glasträger gebunden und blockiert. Anschließend gibt man nacheinander die vier Nucleotide hinzu (in diesem Beispiel wird zunächst G hinzugefügt, dann T). Eine Maske deckt jene Bereiche ab, die bei einer bestimmten Reaktion nicht aktiviert werden sollen. Licht aktiviert sämtliche nicht von der Maske verdeckten Gruppen; an diese wird ein Nucleotid gebunden. Danach wird der ganze Vorgang mit dem nächsten Nucleotid wiederholt.

a kurze versus lange Spacer**b kurze versus lange Zielmoleküle****8.22 Die Länge der Spacer- und der Zielmoleküle wirken sich auf die Hybridisierung auf Microarrays aus**

a Ist der Spacer zwischen Glasträger und Oligonucleotid zu kurz, kondensieren die Oligonucleotide und sind damit nicht für die Hybridisierung zugänglich. Ist das Spacermolekül hingegen zu lang, falten sich die Oligonucleotide um und verheddern sich, was ebenfalls eine optimale Hybridisierung verhindert. **b** Ist das Zielmolekül für die Hybridisierung zu lang, kann es vorkommen, dass die Zielsequenzen Haarnadelschleifen mit sich selbst ausbilden, statt an die Oligonucleotide des Arrays zu binden.

hinzugegebene RNA oder DNA nicht an sie anlagern kann. Oligonucleotide mit zu langen Spacern können sich dagegen umfalten und untereinander verwirren. Auch in diesem Fall ist die Sequenz nicht zugänglich für eine Hybridisierung. Sind die Oligonucleotide mit Spacermolekülen mittlerer Länge an das Glas gebunden, befinden sie sich weit genug vom Glas entfernt, aber nicht so weit, dass sie sich verheddern können. Daher ermöglichen mittellange Spacer die beste Zugänglichkeit für die Hybridisierung.

Damit zwei DNA-Abschnitte (beziehungsweise eine RNA und eine DNA) hybridisieren können, müssen die Sequenzen bestimmte Eigenschaften auf-

weisen. Von großer Bedeutung ist beispielsweise die relative Zahl an A-T-Basenpaaren im Vergleich zu G-C-Basenpaaren. Da die G-C-Basenpaare durch drei Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden, ist zum Auftrennen dieser Bindungen mehr Energie erforderlich als bei A-T-Basenpaaren, zwischen denen sich nur zwei Wasserstoffbrücken ausbilden. Mehr G-C-Paare ergeben somit eine stärkere Hybridisierung. Enthält die Sequenz viele A-T-Basenpaare, bildet sich der Doppelstrang langsamer aus und ist weniger stabil. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Sekundärstruktur. Wenn die Sondensequenz eine Haarnadelschleife ausbilden kann, wird sie nur schlecht mit der Zielsequenz hybridisieren. Auch wenn es zwischen Sonde und Zielsequenz zu vielen Fehlpaarungen kommt, bildet sich der Doppelstrang nicht richtig aus. All diese Probleme muss man bei der Herstellung eines Oligonucleotid-Microarrays berücksichtigen. Mittlerweile gibt es Computerprogramme zur Identifizierung geeigneter Genregionen mit Sequenzen, aus denen sich effiziente Sonden ableiten lassen.

cDNA-Arrays sind unproblematischer als Oligonucleotid-Arrays. Da cDNAs bereits doppelsträngig sind, stellen Sekundärstrukturen wie Haarnadelschleifen kaum ein Problem dar. Für eine Hybridisierungsreaktion müssen cDNA-Arrays durch Hitzebehandlung oder mit chemischen Verbindungen denaturiert werden, um einzelsträngige Sonden zu erhalten. Danach gibt man einzelsträngige RNA-Proben unter solchen Bedingungen hinzu, die die Hybridisierung auf dem Träger und die Ausbildung eines RNA-cDNA-Doppelstrangs ohne Fehlpaarungen begünstigen.

Damit bei Oligonucleotid-Microarrays eine Hybridisierung mit den Proben erfolgen kann, müssen die Spacer eine geeignete Länge haben, und die Oligonucleotide dürfen nur wenige Sekundärstrukturen aufweisen.

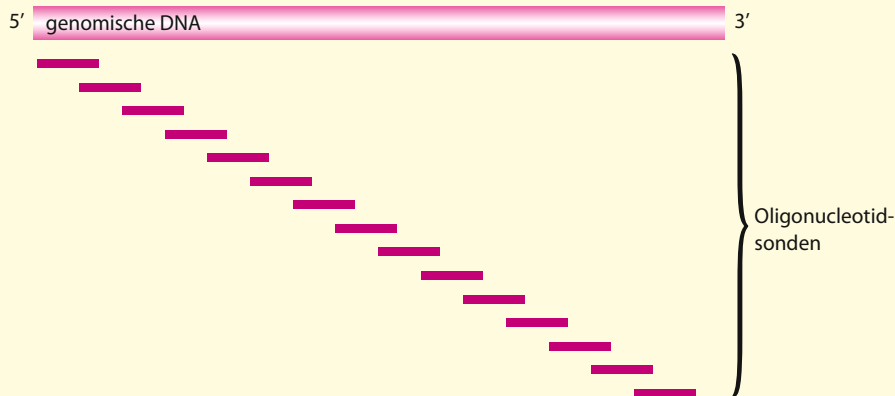
Ermitteln der Genexpression mit genomweiten Tiling Arrays

Genomweite Tiling Arrays sind Oligonucleotid-Microarrays, die das gesamte Genom abdecken. Als erstes gesamtes Genom wurde das von *Arabidopsis* (Ackerschmalwand) durch einen solchen Array re-

präsentiert. Dazu wurde ein Genchip mit 25-mer Oligonucleotiden hergestellt, die einander überlappen und die gesamte Sequenz des Genoms umfassen. Komplementäre Oligonucleotidsequenzen entlang sämtlicher Chromosomen wurden nacheinander so angeordnet, dass sich mit dem Array die Genexpression bequem analysieren ließ (Abb. 8.23).

Für das menschliche Genom wurden Tiling Arrays hergestellt, welche die kompletten Sequenzen der Chromosomen 21 und 22 abdecken. Auch hierzu werden Oligonucleotide aus 25 Basenpaaren verwendet, allerdings nicht überlappend, sondern jeweils im Abstand von 35 Basenpaaren entlang der Sequenz. Damit handelt es sich genau genommen nur um

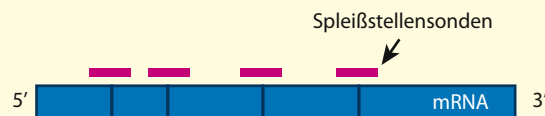
genomweiter Tiling Array



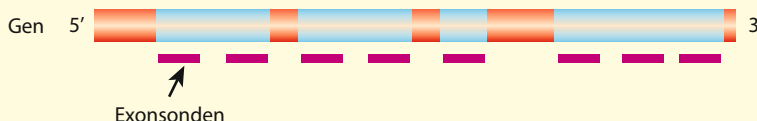
quasi-genomweiter Array



splice junction array (Spleißstellen-Array)



exon-scanning array (All-Exon-Array)



8.23 Genomweite Arrays

Die überlappenden Oligonucleotide auf genomweiten Tiling Arrays decken das gesamte Genom eines Organismus ab. Bei quasi-genomweiten Arrays sind die Sonden in gleichen Abständen über das Genom verteilt. Mit Ausnahme der Lücken zwischen den Sonden decken diese somit das gesamte Genom ab. Die sogenannten *splice junction arrays* („Spleißstellen-Arrays“) umfassen nur Sonden strangaufwärts und strangabwärts von bekannten Spleißstellen in der mRNA. Bei *exon-scanning arrays* stammen die Sonden ausschließlich aus Exonsequenzen.

„quasi-genomweite Arrays“. Im Vergleich zu Arrays, die nur bekannte Gene umfassen, hat man mit Tiling Arrays auch die Möglichkeit, neue Regionen zu identifizieren, die transkribiert werden; dabei kann es sich um unbekannte, proteincodierende Gene oder um nichttranslatierte RNA handeln. Zur Ermittlung der Genexpression wurde aus vielen verschiedenen Zelllinien und Geweben extrahierte RNA verwendet; ebenso zur Feststellung von Unterschieden im Spleißmuster sowie zum Auffinden neuer Gene und Zielsequenzen für RNA-bindende Proteine.

Als interessantestes Resultat ergab sich bei der Analyse der menschlichen Chromosomen 21 und 22, dass viel größere Abschnitte dieser Chromosomen in mRNA transkribiert werden, als zuvor anhand von Computeranalysen der Exonregionen prognostiziert. Ungefähr 90 % der transkribierten Abschnitte befanden sich außerhalb der bekannten Exons. Die Mehrzahl der transkribierten Regionen erzeugte nichtcodierende RNA, meist von weniger als 75 Basenpaaren Länge. Das lässt darauf schließen, dass die nichtcodierende RNA für die Biologie des Menschen eine weitaus wichtigere Rolle spielt, als zuvor angenommen. Mit diesen Arrays konnten auch neue, bislang nicht bekannte Exons identifiziert werden. Außerdem lassen sich mit diesen Arrays neue, durch alternatives Spleißen entstandene Proteine identifizieren. Anhand der genomweiten Arrays für die Chromosomen 21 und 22 hat man auch das Ausmaß der Expression von Exons innerhalb desselben Gens verglichen. Rund 80 % der Gene enthielten unterschiedlich stark exprimierte Exons, was ebenfalls darauf hindeutet, dass die meisten Gene alternativ gespleißt werden können.

Eine weitere potenzielle Anwendungsmöglichkeit für genomweite Arrays ist die Analyse der Ergebnisse von **Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP)**. Zu Beginn der ChIP werden all die verschiedenen Transkriptionsfaktoren an Chromatin gebunden und damit quasi an einer Stelle fixiert. Anschließend wird das Chromatin in kleinere Fragmente geschnitten, und die DNA-Transkriptionsfaktor-Komplexe isoliert. Durch Affinitätsreinigung kann man jeweils einen bestimmten Transkriptionsfaktor von allen anderen trennen (z.B. isolieren Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor Jun sämtliche Jun-DNA-Komplexe aus diesem Gemisch). Schließlich werden die an ausgewählte Transkriptionsfaktoren gebundenen DNA-Sequenzen mithilfe von genomweiten Arrays identifiziert. Diese gesamte Prozedur, einschließlich der Gen-Chip-Analyse, bezeichnet man als **ChIP-Chip**. Mit dieser Form der Analyse lassen sich die

Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren bei einer Vielzahl von Genen präzise bestimmen. Eigenartigerweise hat man Bindungsstellen für NF- κ B beispielsweise sowohl in codierenden als auch in nichtcodierenden Abschnitten gefunden, etwa in Introns oder an den 3'-Enden von Genen. Dieses überraschende Ergebnis legt nahe, dass Transkriptionsfaktoren auch außerhalb der bekannten Promotorregion strangaufwärts eine Funktion haben könnten.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für genomweite Arrays ist die Identifizierung von methylierten Bereichen des Genoms. Die Methylierung verhindert die inadäquate Exprimierung verschiedener Gene. Dazu gehören insbesondere solche Gene, die nur während der Entwicklung bei jungen Organismen verwendet werden, oder auch die potenziell schädlichen Gene von Transposons oder Viren. Krebszellen sind durch ein völlig anderes Methylierungsmuster gekennzeichnet als normale Zellen. Das lässt darauf schließen, dass diese Form der Regulation entscheidend für eine angemessene Kontrolle des Wachstums normaler Zellen ist. Um solche methylierten Regionen zu identifizieren, behandelt man die genomische DNA zunächst mit **Natriumhydrogensulfit (Natriumbisulfit)**. Dieses desaminiert nichtmethyliertes Cytosin zu Uracil, methyliertes Cytosin bleibt davon jedoch unbeeinflusst. Die so behandelte DNA wird anschließend mit einem genomweiten Array hybridisiert. Regionen mit nichtmethyliertem Cytosin hybridisieren nun nicht mehr mit dem Array, weil dieses Cytosin jeweils in Uracil umgewandelt wurde (das eine Basenpaarung mit A statt mit G ausbildet). Die methylierten Abschnitte des Genoms hybridisieren hingegen nach wie vor gut, weil methyliertes Cytosin und Guanin stabile Basenpaarungen bilden.

Natürlich zielen Genomanalysen besonders darauf ab, genetische Variationen und Polymorphismen zu finden. Mit den genomweiten Arrays hat man nun eine unvoreingenommene Analysemethode zur Hand. Tatsächlich kann man ein genomweites Array mit der Referenzsequenz für das menschliche Genom dazu verwenden, all die verschiedenen Formen von Polymorphismen wie SNPs, VNTRs und repetitive Elemente zu identifizieren und zu katalogisieren.

Genomweite Arrays sind Oligonucleotid-Arrays, deren Sequenzen das gesamte Genom abdecken. Mit diesen Arrays kann man unter anderem Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, methylierte Regionen, SNPs, VNTRs und repetitive Elemente identifizieren.

Ermitteln der Expression einzelner Gene

Microarrays liefern zwar einen umfassenden Überblick über die Genexpression, die Ergebnisse bieten jedoch nicht viele Informationen über einzelne Gene. Hat man durch Microarrays bestimmte Kandidatengene ins Auge gefasst, kann man diese einzeln analysieren. Um den exakten Ort und/oder das Ausmaß der Expression zu ermitteln, ist es möglich, das betreffende Gene mittels **Genfusion** mit einem Reportergen zu verknüpfen (s. unten). Als Erstes wird die regulatorische Region des betreffenden Gens isoliert. Normalerweise befindet sich dieser Abschnitt strangaufwärts des Gens, er enthält Stellen, an die Transkriptionsfaktoren binden können, sowie zusätzliche Enhancer-Elemente. Die codierende Sequenz des betreffenden Gens wird durch das Reportergen ersetzt, sodass die regulatorischen Elemente nun das Reportergen kontrollieren, anstelle des interessierenden Gens.

Reportergene codieren in der Regel für Enzyme, deren Aktivität sich leicht nachweisen lässt. Zu den am häufigsten verwendeten Reportergenen zählt das **lacZ-Gen** von *E. coli*, welches für das Enzym **β -Galactosidase** codiert (Abb. 8.24). Dieses Enzym spaltet Disaccharidzucker in ihre Monomere, aber auch verschiedene künstliche Substrate. Bei der Spaltung des Substrats ONPG bildet eines der Spaltungsprodukte einen auffälligen gelben Farbstoff. Wird X-Gal von der β -Galactosidase gespalten, so reagiert eines der Produkte mit Sauerstoff zu einem blauen Farbstoff.

Ein weiteres Reportergen ist das **phoA-Gen**. Es codiert für **Alkalische Phosphatase**, ein Enzym, das von vielen verschiedenen Substraten Phosphatgruppen abspaltet (Abb. 8.25). Künstliche Substrate werden so hergestellt, dass sie bei der Abspaltung der Phosphatgruppe entweder die Farbe ändern oder fluoreszieren.

Ein weiteres beliebtes Reportergen ist das Gen für **Luciferase**. Dieses Enzym emittiert bei Anwesenheit des passenden Substrats **Luciferin** sichtbares Licht (Abb. 8.26). Codiert wird das Enzym Luciferase durch das **lux-Gen** bei Bakterien und das **luc-Gen** bei Glühwürmchen. Die beiden Luciferasen sind nicht miteinander verwandt und wirken über unterschiedliche enzymatische Mechanismen. Beide Gene bilden gute Reportergene, sie wurden kloniert und mithilfe von Vektoren in viele verschiedene Organismen eingebracht. Wegen seiner geringen In-

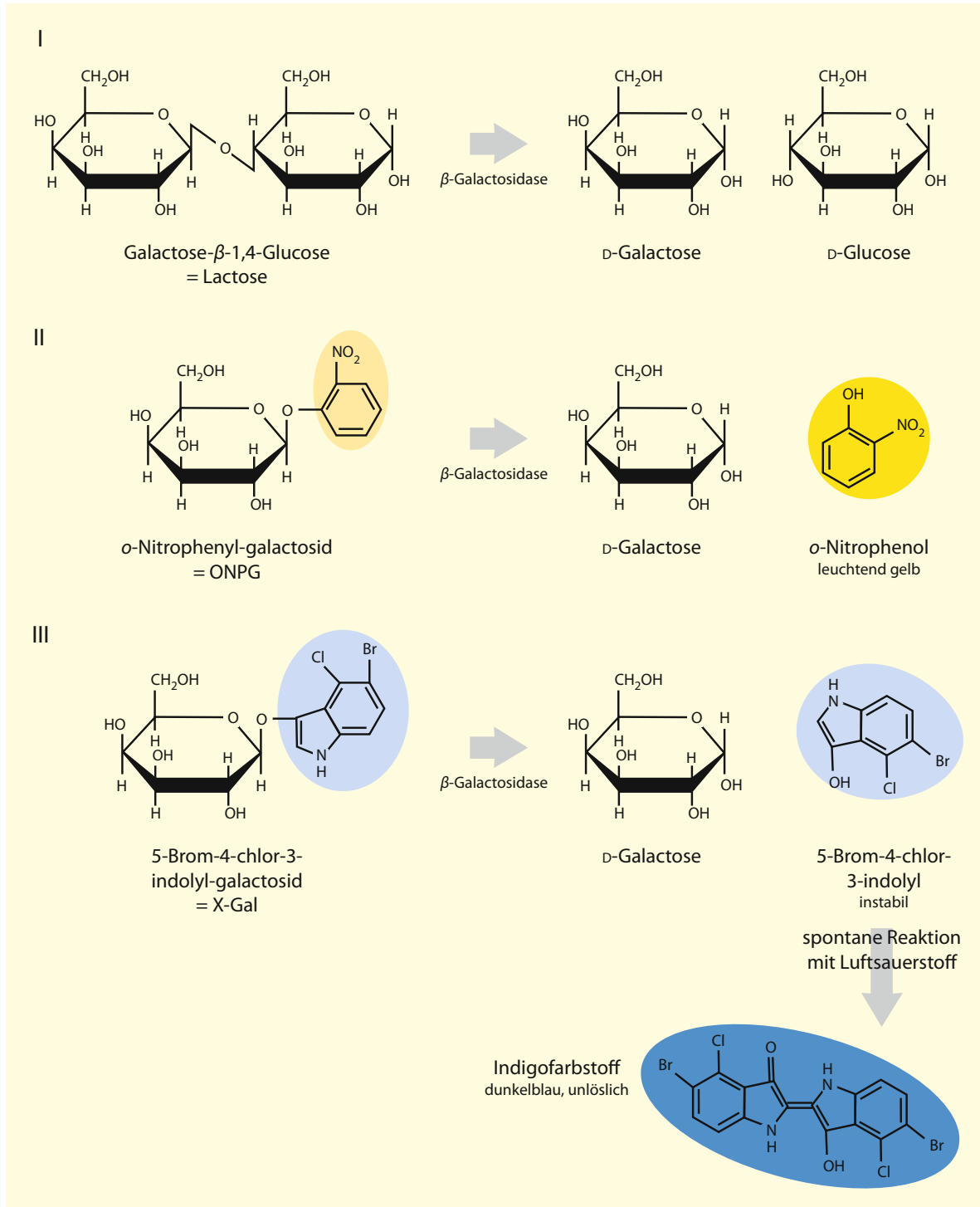
tensität ist das von Luciferase emittierte Licht nur schwer nachzuweisen. Man benötigt dazu spezielle Geräte wie ein Photometer oder einen Scintillationszähler.

Ein weiteres häufig verwendetes Reportergen ist das **grün fluoreszierende Protein (GFP)** (Abb. 8.27); hierbei handelt es sich nicht um ein Enzym. Dieses Protein benötigt für seine natürliche Fluoreszenz keine Cofaktoren oder Substrate. Zudem ist diese Fluoreszenz auch in lebenden Geweben aktiv. Wenn das Protein exprimiert wird, leuchtet der Organismus grün. Besonders auffällig ist das bei durchscheinenden Organismen wie dem Zebrafisch oder dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*. GFP wird durch langwellige UV-Strahlen von 395 nm Wellenlänge angeregt und emittiert dann grünes Licht mit einer Wellenlänge von 510 nm. Ursprünglich stammt das Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*. Codiert wird es von dem Gen *gfp*. Mittlerweile hat man viele neue GFP-Varianten entwickelt, die Licht verschiedener Wellenlängen emittieren, darunter auch rotes, blaues und gelbes Licht. Dass man die Genexpression in lebendem Gewebe sehen kann, gehört zu den großen Vorteilen bei der Verwendung von GFP als Reporter.

Die durch Genexpressions-Microarrays ermittelten Daten lassen sich mithilfe anderer Techniken bestätigen. Differential Display-PCR (s. Kap. 4) eignet sich zum Vergleich von mRNA-Expressionsmustern verschiedener Gewebeproben oder Versuchsbedingungen. Durch subtraktive Hybridisierung kann man ebenfalls Gene identifizieren, die nur unter einer bestimmten Versuchsbedingung exprimiert werden (s. Kap. 3). Schließlich erlaubt ein Northern Blot (s. Kap. 3) das Ausmaß der Expression von mRNA unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu bestimmen.

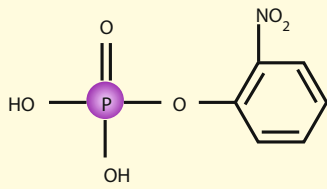
Durch Fusion von Regulationssequenzen eines interessierenden Gens an ein Reportergen lässt sich dessen tatsächliche Genexpression ermitteln.

Reportergene wie die Gene für β -Galactosidase, Alkalische Phosphatase und Luciferase codieren für Enzyme, die ihre Substrate spalten und dabei einen sichtbaren Farbstoff oder Licht erzeugen. Grün fluoreszierendes Protein bringt Organismen zum Leuchten: Es kann Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und Licht einer längeren Wellenlänge emittieren.

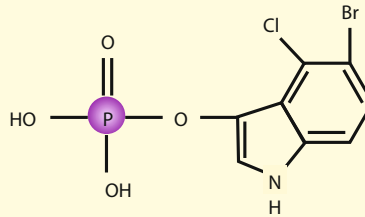


8.24 β -Galactosidase hat viele Substrate

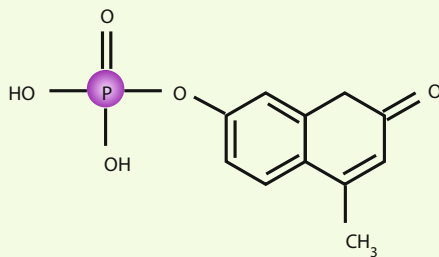
Normalerweise spaltet das Enzym β -Galactosidase Lactose in die beiden Monosaccharide Glucose und Galactose. β -Galactosidase spaltet aber auch künstliche Substrate wie ONPG und X-Gal; die dabei freigesetzten Gruppen bilden deutlich sichtbare Farbstoffe. Bei der Spaltung von ONPG entsteht die leuchtend gelbe Substanz *o*-Nitrophenol, bei der Spaltung von X-Gal hingegen eine instabile Gruppe, die mit Sauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff reagiert.



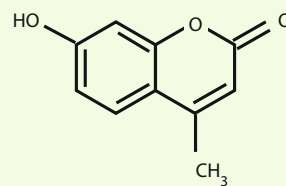
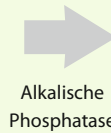
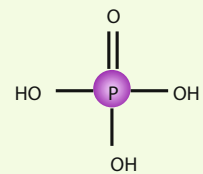
o-Nitrophenylphosphat



5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat = X-Phos



4-Methylumbelliferylphosphat

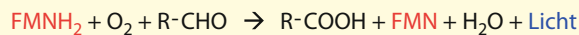
Methylumbelliferon
fluoreszierend

Phosphat

8.25 Substrate des Enzyms Alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase spaltet von verschiedenen Substraten Phosphatgruppen ab. Bei der Abspaltung der Phosphatgruppe von o-Nitrophenylphosphat entsteht ein gelber Farbstoff. Wird die Phosphatgruppe von X-Phos abgespalten, entsteht durch weitere Reaktion mit Sauerstoff ein unlöslicher blauer Farbstoff. Ein fluoreszierendes Molekül ergibt sich bei der Abspaltung der Phosphatgruppe von 4-Methylumbelliferylphosphat.

bakterielle Luciferase:



firefly-Luciferase (aus Glühwürmchen):



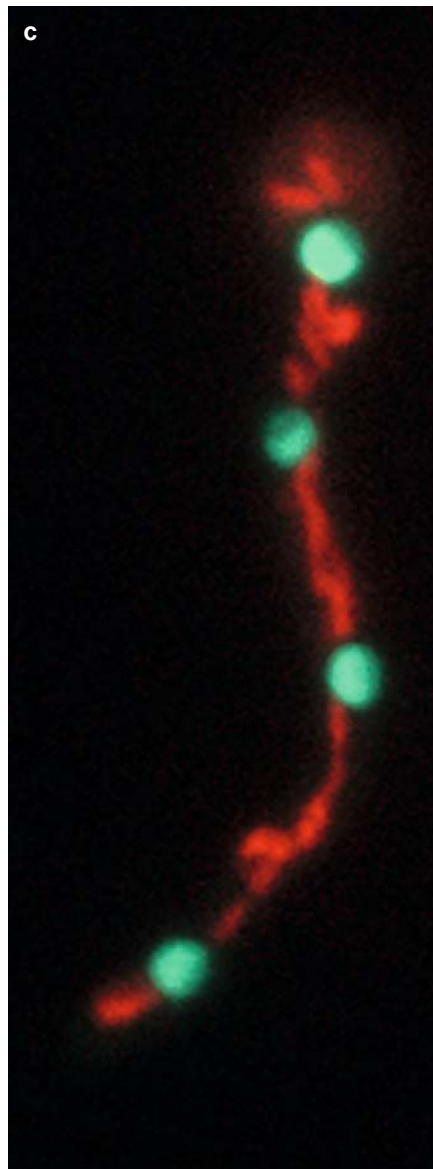
8.26 Bei der Luciferase-Reaktion wird von Luciferin Licht emittiert

Bakterielle Luciferase verwendet als Luciferin ein langkettiges Aldehyd, Sauerstoff und die reduzierte Form des Cofaktors FMN (Flavinmononucleotid). Die Luciferase aus Glühwürmchen (*firefly*-Luciferase) erzeugt Licht aus ATP, Sauerstoff und Glühwürmchen-Luciferin.



8.27 Transgene Organismen mit grün fluoreszierendem Protein

Das Gen für GFP wurde in die Genome von Tieren, Pflanzen und Pilzen eingeschleust. Bei Bestrahlung mit langwelliger UV-Strahlung emittieren diese Organismen grünes Licht. **a** Transgene Mäuse mit GFP zwischen normalen Mäusen aus demselben Wurf. Das *gfp*-Gen wurde in die befruchteten Eizellen injiziert. GFP wird in allen Zellen und Geweben produziert, außer in Haaren. Bildnachweis: Eye of Science, Photo Researchers, Inc. **b** Phasenkontrast- und **c** Fluoreszenzmissionsaufnahme von Keimlingen des Pilzes *Aspergillus nidulans*. Zur Markierung der Mitochondrien wurde Original-GFP verwendet, für die Zellkerne eine rote GFP-Variante (DsRed). Aus Toews et al (2004) *Curr Genet* 45: 383–389.

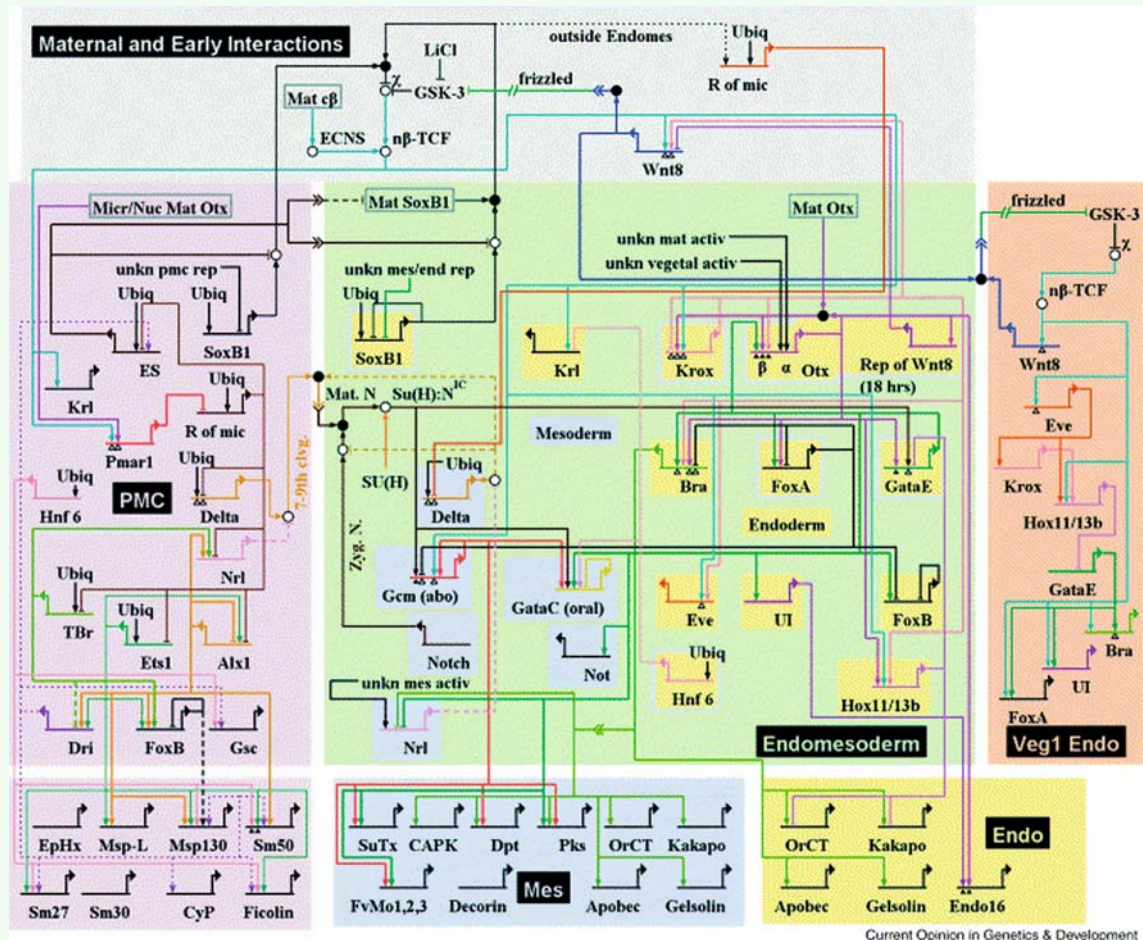


Exkurs 8.1

Spezifizierung des Entomesoderms bei Seeigelembryonen

Durch einen kombinierten Einsatz mehrerer Techniken lässt sich Licht in das Netzwerk der Genregulation während der Embryonalentwicklung bringen. Bei dem Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* erfolgen während der Embryonalentwicklung eine Reihe spezifischer räumlicher und zeitlicher Ereignisse, welche die Entwicklung des Entomesoderms steuern. Der Prozess beginnt in den Vorläuferzellen der Blastula, die sich auch beim adulten Seeigel weiterhin entwickeln und teilen. Die Steuerung der Entwicklung erfolgt durch eine veränderte Genexpression sowie durch variierende Protein-Protein-Wechselwirkungen. Indem man

die Funktion dieser Gene mittels verschiedener Techniken störte, etwa mit Morpholin-Antisense-mRNA, mRNA-Überexpression und Two-Hybrid-Analyse beim Seeigel, konnte man zusammen mit Methoden zur Bestätigung der Lokalisation (*in situ*-Hybridisierung) ein ganzes Netzwerk von Genfunktionen postulieren (Abb.). Die Pfeile zeigen den Einfluss des jeweiligen Gens auf andere Gene oder Proteine. Man kann solche Netzwerke konstruieren und weiter überprüfen, um das Modell zu verbessern. Die neueste Version des entomesodermalen Netzwerkes findet sich unter <http://supg.caltech.edu/endomes/>.



Genomische Ansicht des entomesodermalen Genregulationsnetzwerkes

Das Genregulationsnetzwerk ist in räumliche Domänen unterteilt. Jedes Gen ist als kurze waagerechte Linie dargestellt, von der ein gebogener Pfeil ausgeht, der die Transkription anzeigt. Die Gene sind mit den Namen der Proteine bezeichnet, für die sie codieren. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung aus Oliveri und Davidson (2004) Gene regulatory network controlling embryonic specification in the sea urchin. *Curr Opin Genet Dev* 14: 351–360.

► Weiterführende Literatur

- Brown PO, Botstein D (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 21: 33–37
- Brown TA (2007) *Genome und Gene*, 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497–3500 (S. a. www.ebi.ac.uk/clustalw/.)
- Cho RJ, Campbell MJ, Winzler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ, Davis RW (1998) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* 2: 65–73
- Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Davidson EH, Rast JP, Oliveri P et al (2002) A provisional regulatory gene network for specification of endomesoderm in the sea urchin embryo. *Dev Biol* 246: 162–190
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21: 10–12
- Grewel SIS, Rice JC (2004) Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 16: 230–238
- Khambata-Ford S, Liu Y, Gleason C, Dickson M, Altman RB, Batzoglou S, Myers RM (2003) Identification of promoter regions in the human genome by using a retroviral plasmid library-based functional reporter gene assay. *Genome Research* 13: 1765–1774
- Lima JJ, Thomason DB, Mohamed MH, Eberle LV, Self TH, Johnson JA (1999) Impact of genetic polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 65: 519–525
- Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, Lockhart DJ (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21: 20–24
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M (2007) *Molecular Cell Biology*. 5. Aufl. Palgrave Macmillan
- Madden SL, Wang CJ, Landes G (2000) Serial analysis of gene expression: From gene discovery to target identification. *DDT* 5: 415–425
- Mockler TC, Ecker JR (2005) Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics* 85: 1–15
- Oliveri P, Davidson EH (2004) Gene regulatory network controlling embryonic specification in the sea urchin. *Curr Opin Genet Dev* 14: 351–360
- Southern E, Mir K, Shchepinov M (1999) Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* 21: 5–9
- Toews MW, Warmbold J, Konzack S, Rischitor P, Veith D, Vienken K, Vinuesa C, Wei H, Fischer R (2004) Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination in vitro (GATEWAY). *Curr Genet* 45: 383–389
- Weiner AM (2002) SINEs and LINEs: The art of biting the hand that feeds you. *Curr Opin Cell Biol* 14: 343–350
- Zebrafish Information Network (ZFIN) The Zebrafish International Resource Center, University of Oregon, Eugene, OR 97403-5274; verfügbar unter <http://zfin.org/>; aktualisiert am 8. Mai 2005

Proteomik

Einführung

Gelelektrophorese von Proteinen

Western Blotting von Proteinen

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie dient zur Auftrennung von Proteingemischen

Verdau von Proteinen mit Proteasen

Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Sequenzierung von Peptiden mittels Massenspektrometrie

Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Methoden zum Protein-Tagging

Phagen-Display-Bibliotheken

Protein-Protein-Interaktionen: Das *yeast two hybrid*-System

Protein-Protein-Interaktionen durch Co-Immunpräzipitation

Protein-Arrays

Metabolomik

Weiterführende Literatur

Einführung

Mittlerweile liegt uns nicht nur die Sequenz des menschlichen Genoms vor, sondern auch die Genomsequenzen vieler Tiere, Pflanzen, Pilze und Bakterien. Durch all diese Daten haben die Wissenschaftler einen umfassenden Überblick über die verschiedenen Gene des Menschen und anderer Lebewesen erhalten. Allerdings sind die Gene nur ein erster Schritt, um zu verstehen, wie ein Organismus funktioniert. Gene werden in mRNA transkribiert, und diese wird dann in Proteine translatiert. Um die Genfunktion wirklich zu verstehen, musste man auch das Genprodukt (Protein) charakterisieren – das war der Beginn der **Proteomik**. Unter Proteomik versteht man die umfassende Analyse der Proteine – des **Proteoms**, der Gesamtheit aller Proteine eines Organismus. Das **Translatom**, die Ausstattung an Proteinen unter bestimmten Bedingungen, fällt ebenfalls in dieses Forschungsgebiet. Hierbei ist zu beachten, dass das Translatom dynamisch ist und sich bei veränderten Umweltbedingungen ebenfalls ändert.

Die Beziehungen zwischen Genom, Proteom und Translatom sind nicht linear. Am stabilsten ist das Genom einer Art, aber auch hier gibt es Unterschiede zwischen den Individuen und zwischen einer Generation und der nächsten. Das Proteom steht eng mit dem Genom in Beziehung, weil es sich bei den meisten Genprodukten um Proteine handelt. Einige Gene codieren aber auch für nichttranslatierte RNA und leisten somit keinen Beitrag zum Proteom. Zusätzlich können aus einigen Genen, vor allem bei höheren Eukaryoten, aufgrund von alternativem Spleißen mehrere verschiedene Proteine entstehen. Das Translatom ist im Gegensatz dazu hochgradig dynamisch und verändert sich abhängig von vielen verschiedenen Faktoren von Minute zu Minute.

Das Genom diktiert letztendlich die Veränderungen im Translatom und Proteom, aber nicht immer wirken sich Veränderungen im Genom auch auf das Translatom und Proteom aus. Manchmal werden beispielsweise mRNA-Transkripte erzeugt, aber nie in Proteine translatiert. Die Rate des Abbaus und der Translation der mRNA wirkt sich in hohem Maße darauf aus, wie viel Protein tatsächlich produziert wird. So entsteht von manchen Genen zwar eine große Menge mRNA, aber es wird nur sehr wenig Protein gebildet, weil die Transkripte sehr instabil sind.

Auf das Translatom und Proteom wirken sich auch Modifikationen aus, die erst nach der Translation erfolgen. So wird beispielsweise die Funktion

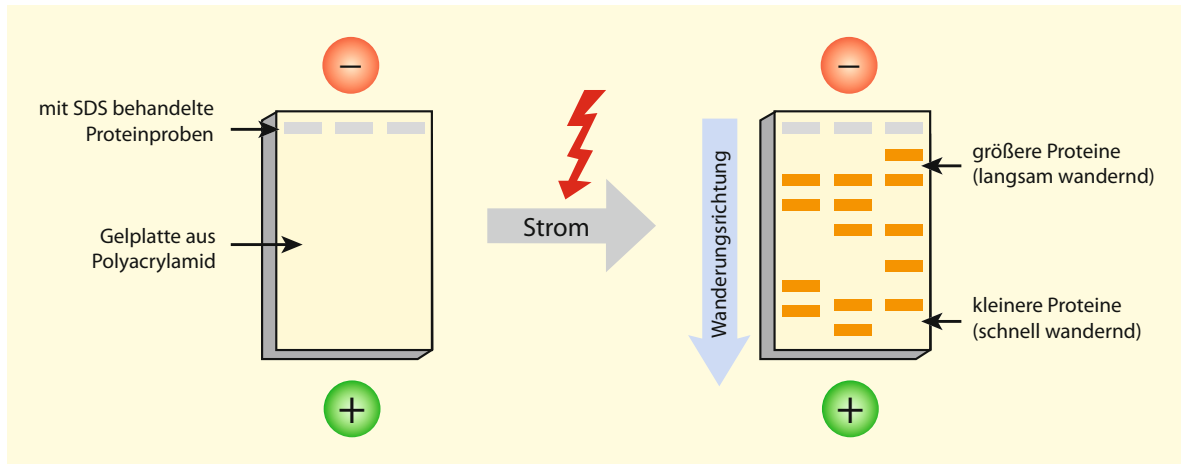
zahlreicher Proteine durch Addition oder Abspaltung verschiedener Gruppen wie Phosphat, Acetyl, AMP oder ADP-Ribose verändert. Viele Proteine, insbesondere bei Eukaryoten, werden auch durch chemische Modifikation von Aminosäureresten abgewandelt. Außerdem unterliegen Proteine einer proteolytischen Spaltung. Die Zusammensetzung des Translatoms wird also durch die Proteinabbaurate beeinflusst, sodass der Stabilität der Proteine eine große Bedeutung zukommt. Schließlich können einige Proteine selbst über verschiedene regulatorische Wirkungen die Expression anderer Proteine beeinflussen. All diese Faktoren wirken sich auf die Proteinausstattung einer Zelle aus.

Die Proteomik erforscht die Gesamtheit der Proteine eines Organismus.

Gelelektrophorese von Proteinen

Um Proteine einer Analyse unterziehen zu können, muss man die Proteine einer Probe zunächst isolieren und identifizieren. Im ersten Schritt erfolgt die Auftrennung. Genau wie die Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA nach ihrer Größe verwendet wird, so setzt man zur Größenauftrennung von Proteinen die **Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)** ein (Abb. 9.1). Polyacrylamid hat kleinere Poren als Agarose und eignet sich daher für Proteine, denn diese sind im Allgemeinen kleiner als DNA-Moleküle. Legt man an eine Proteinprobe ein elektrisches Feld an, so können Proteine geringerer Größe die Poren des Polyacrylamids leichter umschiffen und wandern schneller vom negativ geladenen Pol weg als größere Proteine.

Im Gegensatz zu DNA weisen Proteine keine negative Nettoladung auf, einige sind sogar positiv geladen. Deshalb behandelt man Proteine durch Kochen mit **Natriumdodecylsulfat (SDS; engl. sodium dodecyl sulfate)**. Dadurch werden die Polypeptidketten aufgefaltet, und der gesamte Aminosäurestrang wird von negativ geladenem SDS umhüllt. Die Menge an SDS und damit die Ladungsmenge korreliert mit der Länge (also der Molekülmasse) des Proteins. Wie bei der DNA-Elektrophorese wird die Proteinprobe in eine Geltasche gegeben und ein elektrischer Strom angelegt, sodass die Proteine durch das Acrylamidgel wandern.



9.1 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

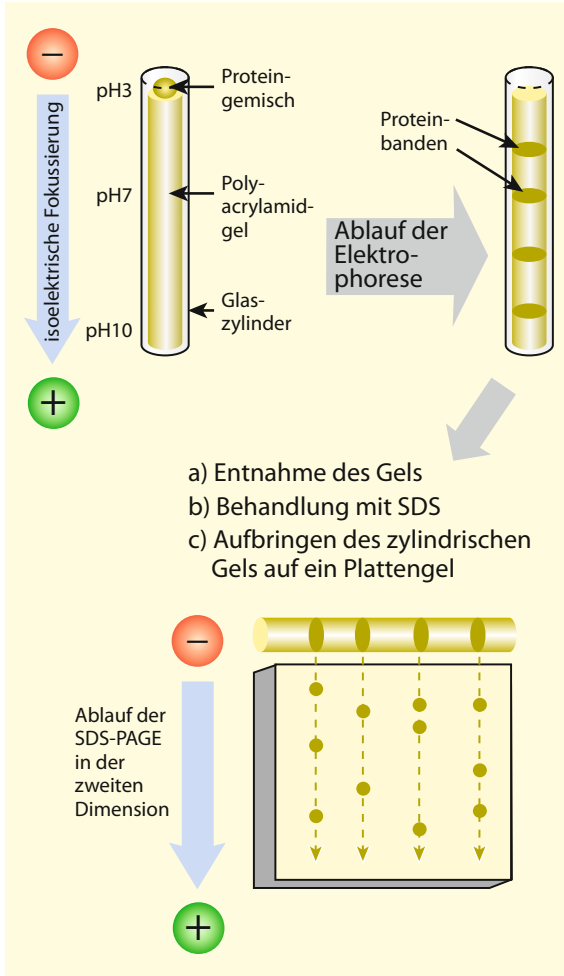
Zunächst trennt man eine Probe mit einer großen Zahl von Proteinen nach ihrer natürlichen Ladung auf. Man unterzieht die Proteine einer Elektrophorese durch eine Röhre mit Polyacrylamidgel mit einem pH-Gradienten. Die Proteine wandern in dem Gradienten, bis ihre Ladung neutralisiert ist. Danach wird das Gel aus der Röhre entfernt, mit SDS behandelt und auf ein Plattengel aufgebracht. Anschließend werden die Proteine wie zuvor beschrieben in der zweiten Dimension nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zum Schluss werden die aufgetrennten Proteine durch **Coomassie-Blau**, einen dunkelblauen Farbstoff, oder die empfindlichere **Silberfärbung** sichtbar gemacht; beide Farbstoffe binden fest an alle Proteine.

Zellen enthalten Tausende von Proteinen, davon viele ähnlicher Größe. Will man einzelne Proteine in einem Acrylamidgel in separate Banden auftrennen, darf die Probe nur wenige Proteine enthalten und diese müssen von unterschiedlicher Größe sein. Eine Probe aus einer gesamten Zelle enthält so viele Proteine, dass die einzelnen Banden miteinander verschmieren. Um dieses Problem zu umgehen, wendet man eine **zweidimensionale PAGE (2-D-PAGE)** an. Hierbei werden die Proteine zunächst in der ersten Dimension nach ihrer natürlichen Ladung aufgetrennt und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrer Größe (Abb. 9.2). Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer natürlichen Ladung bezeichnet man als **isoelektrische Fokussierung**. Sämtliche Proteine weisen aufgrund der Seitenketten ihrer Aminosäurereste von Natur aus eine Ladung auf. Aus der Gesamtzahl der positiv und negativ geladenen Aminosäuren ergibt sich die natürliche Ladung eines Proteins. Zur Auftrennung nach der Ladung trägt man die Probe auf ein Gel mit einem pH-Gradienten auf. Legt man nun ein elektrisches Feld an, so wandern die Proteine entlang des pH-Gradienten, bis ihre Ladung neutralisiert ist. Dieser Schritt erfolgt

gewöhnlich in einem zylindrischen Gel. Nach dem Durchlauf entnimmt man das Gel aus dem Zylinder. In der zweiten Dimension der 2-D-PAGE erfolgt die Auftrennung nun nach der Größe. Dazu behandelt man das zylindrische Gel, das die aufgetrennten Proteine enthält, mit SDS, denaturiert so die Proteine und umgibt sie mit einer negativen Ladung wie in einer normalen PAGE. Anschließend legt man den Gelstreifen auf die Oberkante eines plattenförmigen Polyacrylamidgels, in dem die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur Sichtbarmachung wird das Gel, wie schon zuvor beschrieben, angefärbt.

Mit der 2-D-PAGE kann man viele Proteine auftrennen. Bei frühen Untersuchungen von *E. coli* hat man mittels 2-D-PAGE sämtliche unter unterschiedlichen Bedingungen vorkommenden Proteine charakterisiert – insgesamt etwa 1000 verschiedene Proteine. Zur Analyse umfangreicherer Proteome wurden größere 2-D-PAGE-Gels entwickelt. Mit diesen lassen sich über 10000 verschiedene Proteine in einzelne Punkte auftrennen. Jeden Punkt auf einem 2-D-Gel zu identifizieren, ist eine gewaltige Aufgabe. Zur Erforschung des Translatoms oder Proteoms können Wissenschaftler die Proteine anfärben und jeden einzelnen interessierenden Punkt herausgreifen. Jedes in einem Gelstück festgehaltene Protein kann in Peptidfragmente verdaut und mittels Massenspektrometrie (s. weiter unten) identifiziert werden. Als weite-



9.2 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zunächst wird eine Probe mit einer großen Zahl von Proteinen nach ihrer natürlichen Ladung aufgetrennt. Dazu durchlaufen die Proteine eine Elektrophorese in einem zylinderförmigen Polyacrylamidgel mit einem pH-Gradienten. Die Proteine wandern entlang des Gradienten, bis ihre Ladung neutralisiert ist. Anschließend wird das Gel entnommen, mit SDS behandelt und auf ein Plattengel gebracht. Nun werden die Proteine in der zweiten Dimension nach ihrer Größe getrennt, wie zuvor beschrieben.

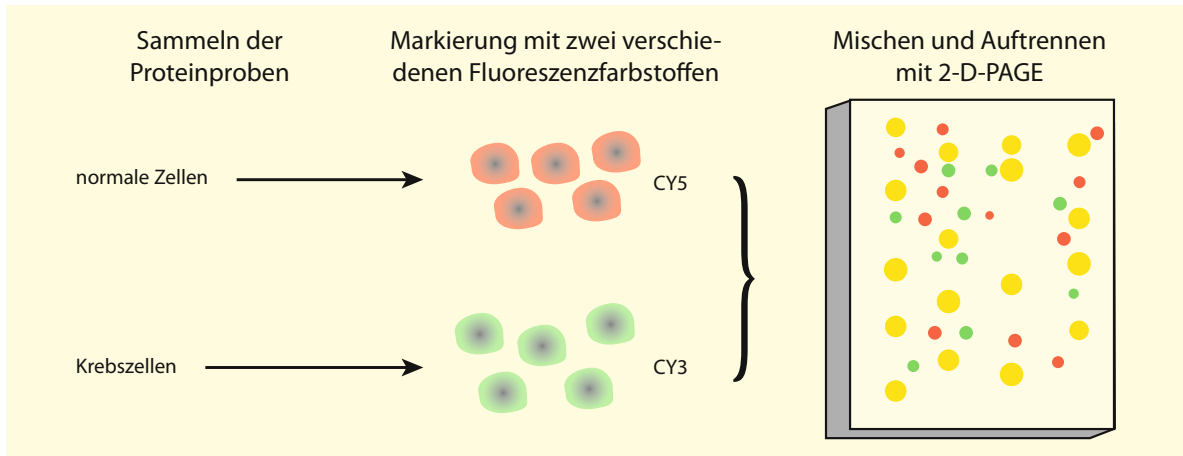
res entscheidendes Merkmal der 2-D-PAGE kommt hinzu, dass man damit die relativen Mengen verschiedener Proteine quantifizieren kann. Die Größe eines Fleckes zeigt die relative Häufigkeit dieses Proteins an. Mithilfe eines Lasers kann es quantifiziert werden. Die Dichte des Fleckes und die relative Häufigkeit werden mittels Computeranalyse ermittelt.

Für einen Vergleich der unter verschiedenen Bedingungen vorhandenen Proteine kann man zwei unterschiedliche Proben gemeinsam durch dasselbe Gel laufen lassen (Abb. 9.3). Jede Probe wird dabei mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Fluoreszenzmarker wie Methyl-Cy5 und Propyl-Cy3 fluoreszieren in verschiedenen Farben, haben aber keinen Einfluss auf die Proteinauftrennung in der 2-D-PAGE. Nachdem beide Proben auf dem selben Gel gelaufen sind, werden die Farbstoffe mit Licht aktiviert. Wo in Probe 1 ein Protein vorkommt, das in Probe 2 nicht enthalten ist, fluoresziert der Punkt rot; existiert in Probe 2 ein nicht in Probe 1 enthaltenes Protein, so sieht der Punkt grün aus. Ist in beiden Proben die gleiche Menge des gleichen Proteins enthalten, leuchtet der Punkt gelb. Anschließend kann man die einzigartigen Proteine isolieren, verdauen und durch Massenspektroskopie identifizieren (s. weiter unten).

Die 2-D-PAGE ist zwar weithin in Gebrauch, hat aber auch einige Nachteile. Bestimmte Proteinklassen sind auf dem Gel unterrepräsentiert, weil sie nicht durch Acrylamid wandern. Extrem große Proteine können oft nicht in die Gelmatrix eindringen, während kleine mitunter am Ende des Gels wieder hinauslaufen. Hydrophobe Proteine wandern zwar unter Umständen durch das Gel, aber ihre Dynamik wird aufgrund ihrer hydrophoben Oberflächen verändert. So laufen diese Proteine häufig an andere Stellen, als aufgrund ihrer Molekülmasse erwartet. Proteine, die in der Zelle nur in sehr geringen Mengen vorkommen, wie Transkriptionsfaktoren, sind – wenn überhaupt – selbst mit den empfindlichsten Farbstoffen kaum sichtbar. Häufige Proteine hingegen machen bisweilen eine genaue Lokalisation anderer Proteine in der näheren Umgebung unmöglich, weil das Gel von ihnen dort zu stark gesättigt ist. Als weiteres Problem kommt bei der 2-D-PAGE hinzu, dass man die Proteine zur massenspektrometrischen Analyse aus dem Acrylamid isolieren muss (s. später).

Mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese kann man ein Gemisch aus Proteinen anhand ihrer Größe auftrennen. Zunächst werden die Proteine mit SDS behandelt und erhalten dadurch eine negative Ladung. Nach Anlegen von elektrischem Strom wandern die Proteine vom negativ geladenen Pol zum positiv geladenen Pol.

In der zweidimensionalen PAGE werden Proteine zunächst mittels isoelektrischer Fokussierung nach ihrer natürlichen Ladung aufgetrennt. Anschließend erfolgt dann die Auftrennung nach Größe durch SDS-PAGE.



9.3 Zweifarbiges 2-D-Gel

Proteine, beispielsweise aus normalen Zellen und Krebszellen, lassen sich direkt auf demselben Gel vergleichen, indem man jedes mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Wenn die Farbstoffe im Gel durch Licht sichtbar gemacht werden, zeichnen sich Proteine, die nur in normalem Gewebe vorhanden sind, als rote Punkte ab, die nur in Krebsgewebe enthaltenen Proteine bilden grüne Punkte, in beiden Geweben vorkommende sehen gelb aus.

Western Blotting von Proteinen

Häufig erfolgt die Identifizierung von Proteinen mittels **Western Blotting**. Für Western Blots benötigt man einen Antikörper gegen das Protein (s. Kap. 6). Antikörper sind extrem spezifisch und binden nur an ein einziges Zielprotein.

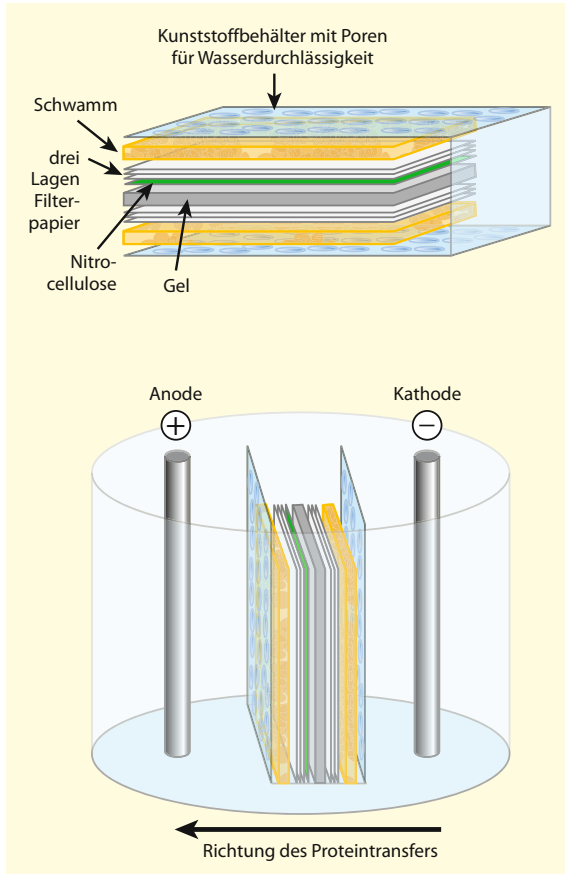
Im ersten Schritt werden die Proteine durch eine normale SDS-PAGE oder 2-D-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend überträgt man die Proteine von dem Gel auf eine Trägermembran aus **Nitrocellulose**. Alternativ kann man auch etwas festere Membranen aus Nylon verwenden. Auf jeden Fall muss die Membran eine positive Ladung aufweisen, damit die negativ geladenen Proteine an ihrer Oberfläche haften bleiben. Die Proteine werden mittels eines elektrischen Stroms, wie in Abbildung 9.4 dargestellt, vom Gel auf die Membran übertragen.

Nach Bindung der Proteine an die Nitrocellulosemembran lokalisiert man das Zielprotein mithilfe eines **primären Antikörpers**. An vielen Stellen der Membran wird jedoch kein Protein gebunden sein, weil der entsprechende Bereich des Proteingels leer war. Diese freien Bereiche sind positiv geladen und können unspezifisch an den Antikörper binden. Daher müssen diese Stellen blockiert werden. Oft wer-

den dazu Lösungen von fettfreiem Milchpulver verwendet. Die Milcheiweiße besetzen die freien Stellen auf der Membran, sodass die Antikörper hier nicht binden können. Anschließend wird der Antikörper in einer Lösung der Membran zugegeben. Der Antikörper bindet ausschließlich an sein Zielprotein und nirgendwo sonst an der Membran, denn er erkennt nur ein spezifisches Epitop seines Zielproteins (s. Kap. 6).

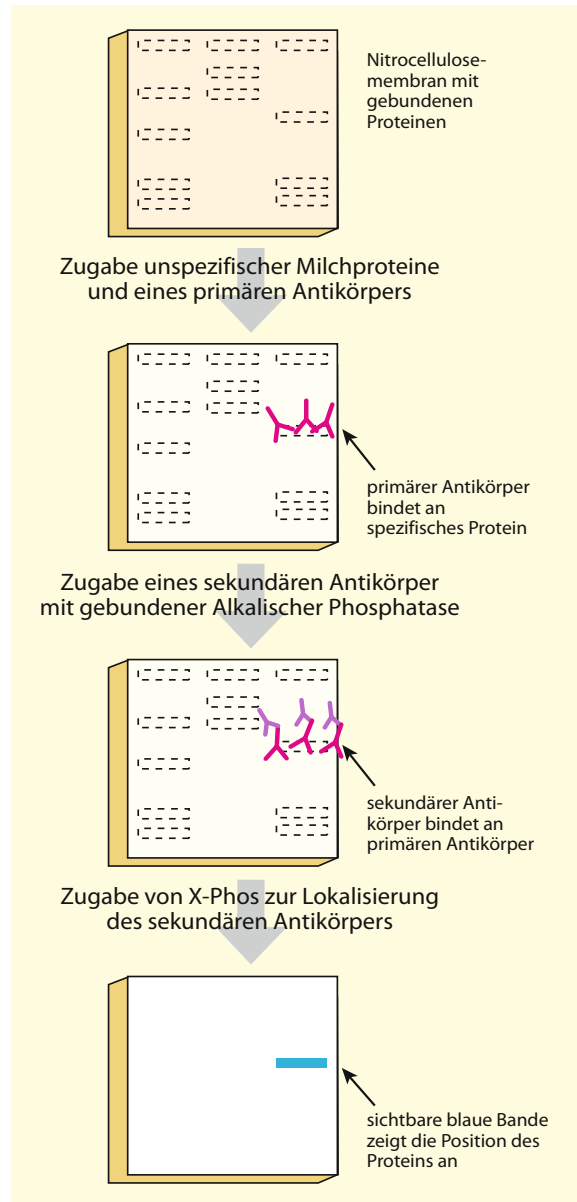
Im nächsten Schritt werden die Positionen der primären Antikörper sichtbar gemacht und damit das Zielprotein lokalisiert (Abb. 9.5). Dazu wird ein sekundärer Antikörper hinzugegeben. Dieser erkennt die Fc-Region des primären Antikörpers, ohne dessen Bindung an das Protein zu beeinflussen. Der **sekundäre Antikörper** trägt an seinem Fc-Bereich einen leicht nachweisbaren Marker. Als Marker dient häufig Alkalische Phosphatase, die von verschiedenen Substraten Phosphat abspaltet (s. Kap. 8). Inkubiert man den Antikörperkomplex mit einem chromogenen Substrat wie X-Phos, so spaltet die Alkalische Phosphatase die Phosphatgruppe von X-Phos ab. Die verbleibende Indolylgruppe reagiert mit Sauerstoff und bildet an der Position des Zielproteins ein blaues Präzipitat. Bei Verwendung eines chemilumineszierenden Substrats platziert man die Nitrocellulosemembran vor einen fotografischen Film. Durch die Lichtimpulse wird der Film an den Stellen geschwärzt, an denen der Komplex sekundärer

Antikörper/primärer Antikörper/Zielprotein auf der Membran lokalisiert ist. Western Blots werden sehr häufig sowohl für den Nachweis verwendet, ob ein Protein exprimiert wurde, als auch, um das Ausmaß der Expression abzuschätzen. Die Intensität des Fleckes steht direkt mit der Proteinmenge in Zusammenhang.



9.4 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen vom Gel auf Nitrocellulose

Durch eine sandwichartige Anordnung bleibt das Gel in einer großen Wanne mit Pufferlösung in engem Kontakt mit einer Nitrocellulosemembran. Das „Sandwich“ besteht aus dem Gel (grau) und der Nitrocellulose (grün) zwischen Schichten aus dickem Filterpapier und einem Schwamm (gelb). Der gesamte Stapel wird fest zusammengepresst, sodass die Schichten nicht verrutschen können. Dieses Sandwich gibt man dann in eine große Wanne mit Pufferlösung, welche den Strom leitet. Wie bei der SDS-PAGE werden die Proteine von der negativ geladenen Kathode abgestoßen und von der positiv geladenen Anode angezogen. Die Proteine wandern aus dem Gel in die Nitrocellulosemembran und bleiben dort haften.



9.5 Western Blot

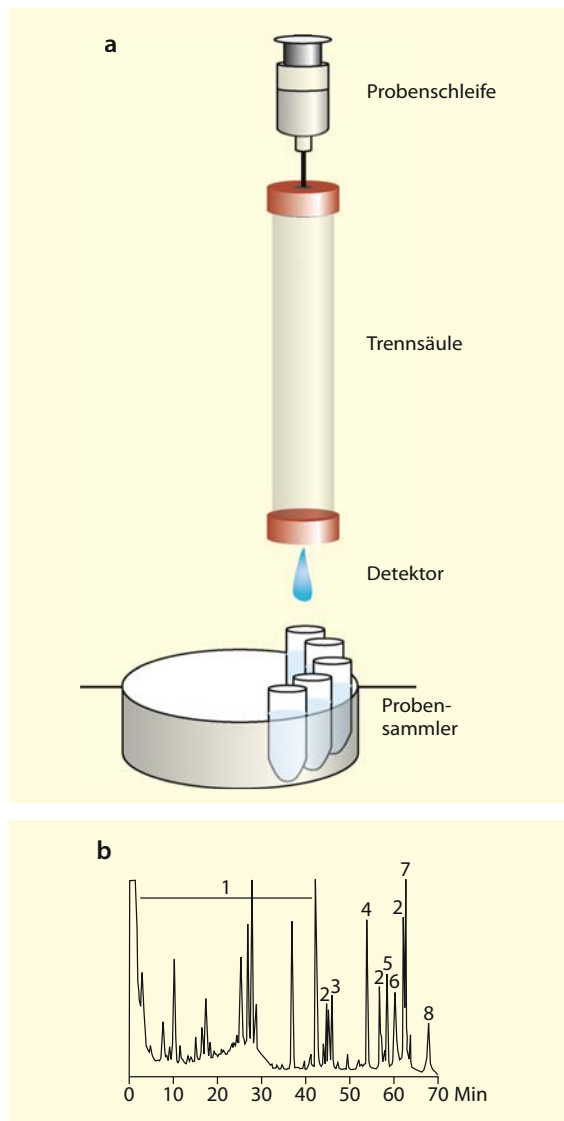
Nach Bindung eines Proteingemisches an die Nitrocellulosemembran kann man mithilfe eines Antikörpers spezifisch einzelne Proteine identifizieren. Mit den Antikörpern gibt man eine Lösung aus Milcheiweißen hinzu und inkubiert diese mit der Membran. Die Milchproteine blockieren jene Bereiche der Nitrocellulose, an denen keine Proteine gebunden sind. Der primäre Antikörper bindet ausschließlich an das Zielprotein. An den primären Antikörper bindet spezifisch ein sekundärer Antikörper, mit einer Alkalischen Phosphatase als Marker. Dadurch kann man die Position des Zielproteins sichtbar machen. In diesem Beispiel reagiert die Alkalische Phosphatase mit dem Substrat X-Phos und bildet einen blauen Farbstoff (s. Kap. 8).

Mit Western Blots kann man spezifische Proteine nach Auftrennung mittels SDS-PAGE lokalisieren. Zunächst bindet ein primärer Antikörper, der ein bestimmtes Epitop erkennt, an das betreffende Protein. Die Position des primären Antikörpers wird durch Zugabe eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht, an den ein Detektionssystem gebunden ist.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie dient zur Auftrennung von Proteingemischen

Als **Chromatographie** bezeichnet man allgemein Auftrennungstechniken, bei denen eine Probe von Molekülen, der **Analyt**, in einer **mobilen Phase** gelöst und anschließend durch eine **stationäre Phase** gepumpt wird. Bei der 2-D-PAGE ist die mobile Phase der Puffer, die stationäre Phase sind die Gele. Bei der **Hochleistungsflüssigkeits-** oder **Hochdruckflüssigkeitschromatographie** (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) wird die Probe in einer mobilen Phase gelöst und anhand eines spezifischen Merkmals über einer stationären Phase aufgetrennt (Abb. 9.6). Dabei wird die mobile Phase unter hohem Druck durch eine **Chromatographiesäule** oder **Trennsäule** gepumpt, einen engen Zylinder, der die stationäre Phase enthält. Beim Durchlaufen der Säule trennt sich das Gemisch der mobilen Phase auf und man kann die verschiedenen Fraktionen am Ende der Säule sammeln. In dem als **Elution** bezeichneten Prozess wird das Gemisch durch ständiges Hinzufügen von weiterer mobiler Phase durch die Säule geführt. Wenn die mobile Phase wieder aus der Säule austritt, reagiert ein Detektor auf die Moleküle im Eluat und zeichnet einen Peak in ein Chromatogramm.

Für die HPLC gibt es viele Anwendungsmöglichkeiten, darunter die Auftrennung, Identifizierung, Reinigung und Quantifizierung von Proteinen und anderen Analyten. Mittels präparativer HPLC kann man ein spezifisches Protein aus einem Gemisch isolieren und reinigen. Um mit HPLC eine Verbindung identifizieren zu können, benötigt man eine geeignete Detektionsmethode. Trägt das



9.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

a Die mobile Phase besteht aus einer Proteinprobe, die in einem Lösungsmittel gelöst ist, am einfachsten in Wasser. Dieses wird in die Probenschleife injiziert. Anschließend fließt die Probe unter hohem Druck durch die Säule. Je nach Säulentyp laufen die Bestandteile des Gemisches mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Schließlich verlassen die Fraktionen der mobilen Phase die Säule wieder und werden in Glasröhrchen gesammelt. **b** Mit einer Umkehrphasensäule wird ein Gemisch aus Farbstoffen aufgetrennt (Grom™ Sil 120 ODS-5 ST). Die Farbstoffe wurden mit UV-Licht bei 254 nm nachgewiesen und in der folgenden Reihenfolge eluiert: 1. Tartrazin, 2. Amarant, 3. Indigokarmin, 4. Neococcin, 5. Gelborange-S, 6. Fast Green, 7. Brillantblau, 8. Erythosin, 9. Acid Red, 10. Phloxin, 11. Bengalrosa. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Grace Davison Discovery Sciences. <http://www.discoverysciences.com>.

Zielprotein beispielsweise einen Fluoreszenzmarker, kann man einen Fluoreszenzdetektor verwenden. Mit einer speziellen Form der HPLC, der quantitativen HPLC, kann man die Menge des Zielproteins bestimmen. Dazu wird es mit einer Reihe von Standardproteinen bekannter Mengen verglichen. Auf diese Weise lassen sich Veränderungen der Menge eines bestimmten Proteins unter verschiedenen Bedingungen messen. Einer der großen Vorteile der HPLC in der Proteomforschung besteht darin, dass sich die aufgetrennten Proteine bereits in einem flüssigen Zustand befinden, was die weitere Analyse erleichtert.

In der Theorie erscheint die HPLC zwar recht simpel, der eigentliche Auftrennungsprozess eines Gemischs in seine Komponenten ist jedoch ziemlich komplex. Jedes Gemisch ist durch unterschiedliche chemische Eigenschaften gekennzeichnet. Daher verwendet man zu deren Auftrennung auch viele verschiedene feste Phasen. Man kann das Gemisch auch schon vor Beschießen der Säule vorbehandeln, um bestimmte Komponenten zu entfernen oder ihre Chemie zu verändern. So werden beispielsweise durch Behandlung mit Phosphatase Phosphatgruppen aus Proteinen abgespalten. Durch solche Manipulationen kann man dafür sorgen, dass sich das interessierende Protein effizienter aus dem Gemisch isolieren lässt.

HPLC ist sehr anpassungsfähig, weil als stationäre Phase viele verschiedene Materialien verwendet werden können. Die Säulen für die **Ausschlusschromatographie** (auch **Gelfiltrations-** oder **Gelpermeationschromatographie**) enthalten poröse Kügelchen, durch die Proteingemische nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Große Moleküle dringen nicht in die Poren der Kügelchen ein und durchlaufen die Säule rasch, während kleinere Verbindungen in die Kügelchen eindringen und aufgehalten werden. Für Gemische unterschiedlicher Größenordnungen stehen viele verschiedene Porengrößen zur Verfügung. Säulen für die **Umkehrphasenchromatographie** sind mit Silicagelpartikeln gefüllt, an die hydrophobe Alkylketten gebunden sind. Hydrophobe Moleküle werden von der Säule gebunden und aufgehalten, während hydrophile Moleküle schneller eluieren.

Für die **Ionenaustauschchromatographie** wird eine stationäre Phase mit geladenen funktionellen Gruppen verwendet, die Moleküle der Probe mit entgegengesetzter Ladung bindet. Diese Moleküle verbleiben nach dem Durchlauf der Probe in der Säule. Um sie zu eluieren, verändert man die mobile

Phase. Wird zum Beispiel der pH-Wert der mobilen Phase angepasst, so ändert sich dadurch die Nettoladung vieler Proteine, und diese werden aus der Säule freigesetzt. Andere stationäre Phasen bilden Wasserstoffbrücken mit dem Analyt und trennen aufgrund der Gesamtpolarität auf. Bei der **Affinitätschromatographie** enthält die stationäre Phase ein Molekül, welches das Zielprotein spezifisch bindet, z.B. einen Antikörper. Von einem Proteingemisch wird von der stationären Phase also lediglich das Zielprotein gebunden, alle anderen Proteine laufen durch die Säule hindurch. Ändert man die mobile Phase so, dass sie diese Wechselwirkung beeinträchtigt, wird das interessierende Protein freigesetzt.

Für die Analyse der aus der Säule austretenden Moleküle gibt es viele verschiedene Detektoren. In der Regel zeichnen diese für die durchlaufenden Moleküle jeweils Peaks auf. Ein **Brechungsindexdetektor** stellt fest, ob die mobile Phase hindurchgeschicktes Licht bricht. In entsprechenden Fraktionen vorhandene Verbindungen erzeugen eine Lichtstreuung, die von einem Photodetektor als positives Signal aufgezeichnet wird. Je stärker die Streuung, desto höher der Peak, je länger die Streuung, desto breiter der Peak. Bei **UV-Detektoren** mit einer UV-Lichtquelle ermittelt der Detektor, ob die passierende mobile Phase ultraviolettes Licht absorbiert. Mit solchen Detektoren kann man abhängig von der zu analysierenden Substanz eine oder mehrere Wellenlängen überwachen. Mit **Fluoreszenzdetektoren** lassen sich fluoreszierende Verbindungen nachweisen, also solche, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen absorbieren und wieder abstrahlen. **Elektrochemische Detektoren** dienen zur Messung von Verbindungen, die Oxidations- oder Reduktionsreaktionen durchmachen. Immer häufiger wird in der Proteomik die Massenspektrometrie zur Detektion eingesetzt. Durch diese Kombination kann man die durch HPLC aufgetrennten Proteine zur Identifizierung direkt einem Massenspektrometer zuführen.

Ein entscheidender Aspekt der HPLC ist, eine gute Auftrennung der verschiedenen Proteine einer Probe zu erhalten, also eine gute **Auflösung**. Jeder erzeugte Peak sollte symmetrisch und so schmal wie möglich sein. Um eine hohe Auflösung zu erzielen, kann man die Versuchsbedingungen auf vielerlei Weise anpassen. Am naheliegendsten ist eine Änderung der stationären Phase. Manchmal lässt sich die Auftrennung schon durch eine Änderung der Partikelgröße deutlich verbessern. Alternativ

kann man auch die Zusammensetzung der mobilen Phase ändern. Auch die Temperatur wirkt sich auf viele Trennungen aus und sollte daher kontrolliert werden.

Ein Analyt ist eine Probe von Molekülen in Lösung und dient als mobile Phase, die bei der Chromatographie die Säule durchläuft.

Als stationäre Phase dienen unterschiedliche Materialien in einer Säule. Die Eigenschaften dieser Materialien bestimmen, welche Proteine in der Säule zurückgehalten werden und welche aus der Säule herauslaufen.

Die am Ende der Säule austretenden Proteine werden mit verschiedenen Detektoren analysiert. Diese identifizieren die Proteine nach ihrem Brechungsindex, nach UV-Absorption, Fluoreszenz, Radioaktivität oder ihren elektrochemischen Eigenschaften.

Verdau von Proteinen mit Proteasen

Proteasen (auch als **Proteinasen** oder **Peptidasen** bezeichnet) hydrolysieren die Peptidbindungen zwischen den Aminosäureresten einer Polypeptidkette. Manche Proteasen spalten spezifisch an einer oder mehreren Stellen in einem Protein; andere verdauen Proteine hingegen unspezifisch in einzelne Aminosäuren. Die Fähigkeit, Proteine an spezifischen Stellen zu spalten, ist sehr wesentlich für die Massenspektrometrie (s. weiter unten) und viele andere Proteinuntersuchungen. Proteasen werden beispielsweise dazu verwendet, Fusionsproteine zu spalten, oder sie kommen bei der Sequenzierung von Proteinen zum Einsatz, indem sie einzelne Aminosäuren abspalten.

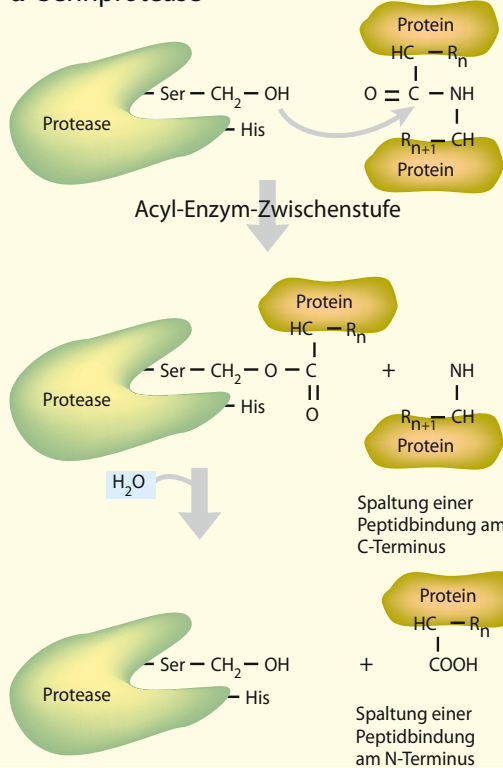
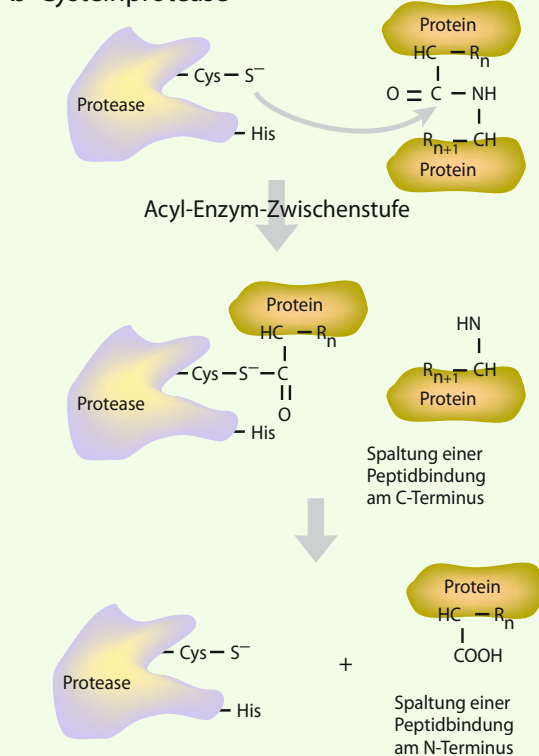
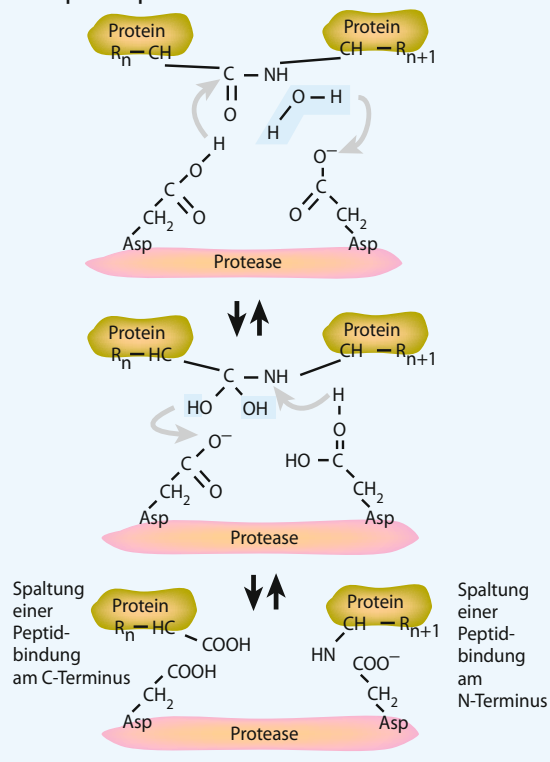
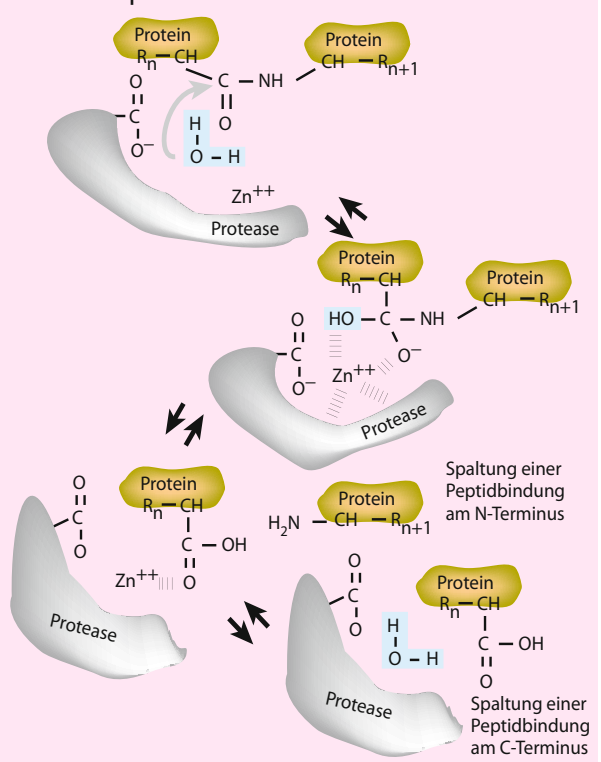
Proteasen finden sich im gesamten Stoffwechsel bei allen Organismen. Beim programmierten Zelltod verdauen Proteasen Zellbestandteile zur Wiederverwendung (s. Kap. 20). Pflanzen verwenden Proteasen als Schutz vor eindringenden Pilzen oder Bakterien. Auch in der biotechnologischen Industrie finden Proteasen vielfach Verwendung. So werden sie beispielsweise Detergenzien beigefügt, um die Proteine von Ketchup-, Blut- oder Grasflecken zu verdauen.

Proteasen werden nach drei Kriterien klassifiziert: die katalysierte Reaktion, die chemischen Eigenschaften des Katalyseortes und ihre evolutionären Beziehungen. **Endopeptidasen** spalten Peptidbindungen innerhalb des Zielproteins, **Exopeptidasen** spalten vom amino- oder carboxyterminalen Ende eines Proteins einzelne Aminosäuren ab. Je nachdem, von welchem Ende her die Exopeptidasen Proteine verdauen, werden sie weiter unterteilt in **Carboxypeptidasen** oder **Aminopeptidasen**. Eine weitere Unterteilung der Proteasen erfolgt anhand des Baus ihres Katalyseortes. **Serinproteasen** haben ein Serin im aktiven Zentrum, das als enzymatische Zwischenstufe kovalent an eines der Proteinfragmente bindet (Abb. 9.7). Zu dieser Klasse gehören beispielsweise die Chymotrypsinfamilie (Chymotrypsin, Trypsin und Elastase) und die Subtilisinfamilie. Ähnlich ist der Mechanismus der **Cysteinproteasen**, nur dass sie anstelle von Serin Cystein nutzen. Hierzu gehören sowohl pflanzliche Proteasen (etwa Papain aus Papayas und Bromelain aus der Ananas) als auch tierische Proteasen wie die Calpaine. Bei **Aspartatproteasen** befinden sich nahe dem aktiven Zentrum zwei essenzielle Aspartatreste, die in der Proteasesequenz allerdings weit voneinander entfernt liegen. Dieser Familie gehören die Verdauungsenzyme Pepsin und Chymosin an. **Metalloproteasen** verdauen Proteine mithilfe von Metallionen als Cofaktoren; ein Vertreter ist z.B. Thermolysin. Die fünfte Klasse von Proteasen bilden schließlich die **Threoninproteasen** mit Threonin im aktiven Zentrum.

Auch Wissenschaftler, die sich mit Proteasen befassen, haben sich der verbreiteten „-omics“-Nomenklatur angepasst und bezeichnen sämtliche zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus exprimierte Proteasen zusammen als **Degradom**. Zur Erforschung des Degradoms eines Organismus dienen weitgehend die gleichen Methoden wie in der Proteomik, durch einige Modifikationen beschränken sich die Analysen jedoch auf die Proteasen statt auf das gesamte Proteom. So enthalten beispielsweise Protease-Chips nur Antikörper gegen bekannte Proteasen und nicht gegen andere Proteine (s. weiter unten).

In der Natur gibt es viele verschiedene Proteasen, die in der Biotechnologie vielfältige Anwendung finden.

Bestimmte Proteasen erkennen spezifische Aminosäuren und spalten Peptidbindungen an bestimmten Stellen.

a Serinprotease**b Cysteinprotease****c Aspartatprotease****d Metalloprotease**

Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Mithilfe der Massenspektrometrie kann man die Masse von Molekülen bestimmen. Hierfür wird ein Molekül in einzelne Ionen fragmentiert, deren Masse exakt gemessen werden kann. Die Ionen erzeugen ein jeweils einzigartiges Spektrum von Peaks, anhand dessen man die Identität des Ausgangsmoleküls feststellen kann. In Abbildung 9.8 dient als Beispiel hierfür das Molekül 2-Pentanol. Ein auf die Probe gerichteter Elektronenstrahl fragmentiert das 2-Pentanol in verschiedene Ionen: Die molekularen Ionen erhalten ein Elektron, $m-1$ verliert einen Wasserstoff aus der Alkoholgruppe, $m-15$ eine Methylgruppe, $m-17$ die Alkoholgruppe, $m/e = 45$ verliert die Alkylkette.

Diese Ionen werden in einer Vakuumröhre beschleunigt. Sie folgen einem Magnetfeld in einer gebogenen Bahn und werden dabei unterschiedlich stark beschleunigt (Abb. 9.9). Durch die Biegung werden zu kleine oder zu große Ionen eliminiert. Zu kleine Ionen erhalten durch das Magnetfeld einen so starken Impuls, dass sie gegen die Wand prallen. Zu große Ionen werden durch das Magnetfeld nicht abgelenkt und prallen ebenfalls gegen die Wand. Ionen der richtigen Größe werden vom Magnetfeld abgelenkt, passieren die Biegungen und gelangen in den Auffänger; dort werden sie im Massespektrum als Peaks aufgezeichnet. Am intensivsten ist der **Basispeak** (engl. *base peak*), die anderen Peaks werden relativ zu diesem gemessen. Wie lange die Ionen vom Beschleuniger bis zum Auffänger benötigen, ist direkt von der Ionengröße abhängig. Jeder Peak wird anhand des Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) aufgezeichnet. Massenverluste (wie $m-17$ oder $m-15$) entstehen dadurch, dass das Ausgangsmolekül spezifische Gruppen verliert. Diese erweisen sich als äußerst informativ zur Ermittlung der Struktur des Probenmoleküls, weil die Gruppen jeweils eine charakteristische Masse besitzen.

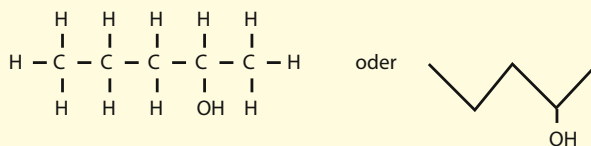
Bis vor nicht allzu langer Zeit konnte man sehr große Moleküle wie Proteine nicht massenspektrometrisch analysieren. Durch die Entwicklung von zwei verschiedenen Ionisierungstechniken ist auch dies nun möglich. Bei der ersten Methode werden die Proteine vor der Ionisierung in eine feste Matrix eingebettet; diese Technik heißt **matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation** (MALDI; engl. *matrix-assisted laser desorption-ionization*) (Abb. 9.10). Hierbei werden die Proteine in ein Material wie 4-Methoxyzimtsäure eingebettet, das Laserstrahlen absorbiert. Die Matrix absorbiert und überträgt die Laserenergie auf die Proteine und bewirkt, dass daraus verschiedene Ionen freigesetzt werden. Diese Ionen werden dann durch ein geladenes Kristallgitter in einer Vakuumröhre beschleunigt. Am Ende zeichnet ein **Flugzeitdetektor** (TOF; engl. *time-of-flight*) die Intensität auf und berechnet die Masse. Dazwischen befindet sich ein **Flugrohr**, das frei von elektrischen Feldern ist. Alle Ionen werden mit der gleichen kinetischen Energie beschleunigt. Die leichteren Ionen fliegen schneller durch das Flugrohr als die schwereren. Die Flugzeit ist proportional zur Quadratwurzel des Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z). Mit der MALDI kann man Ionen von bis zu 100 000 Dalton analysieren.

Eine weitere Methode zur Ionisierung von Proteinen ist die **Elektrosprayionisation** (ESI) (Abb. 9.11). Hierzu wird das Protein in einer Flüssigkeit gelöst und durch eine enge Kapillare in einzelne Tröpfchen zerteilt. Die Tröpfchen gelangen in ein elektrostatisches Feld, wo sie durch ein erhitztes Gas wie Wasserstoff verdunsten und zerstäubt werden. Dadurch werden die Ionen aus dem Protein in die Vakuumröhre freigesetzt, wo sie durch ein elektrisches Feld beschleunigt werden. Die Art des Detektors am Ende variiert je nach zu untersuchender Probe. Man kann, wie beschrieben, einen Flugzeitdetektor verwenden; andere Detektoren nutzen zur Massenbestimmung der Ionen Quadrupol-Ionenfallen oder Fouriertransformation-Ionencyclotronresonanz. Quadrupol-Ionenfallen fangen die Ionen in einem elektrischen Feld. Durch ein zweites elektrisches Feld werden die Ionen dann in den

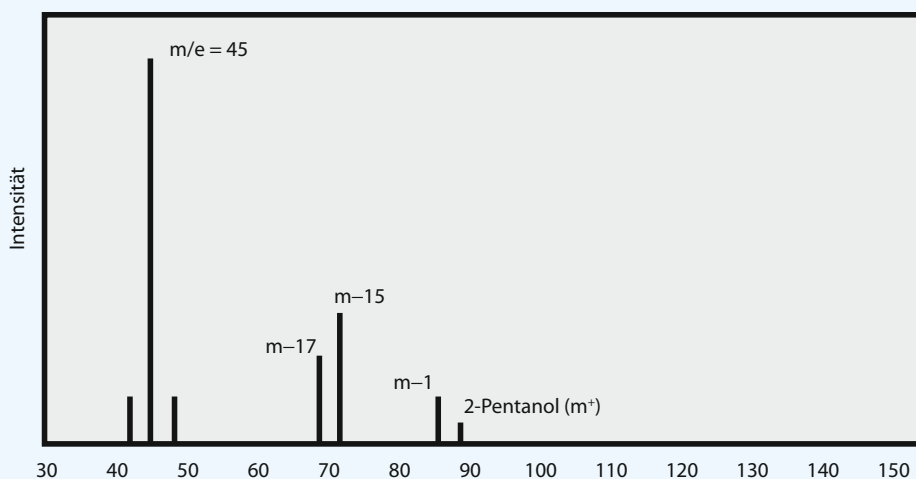
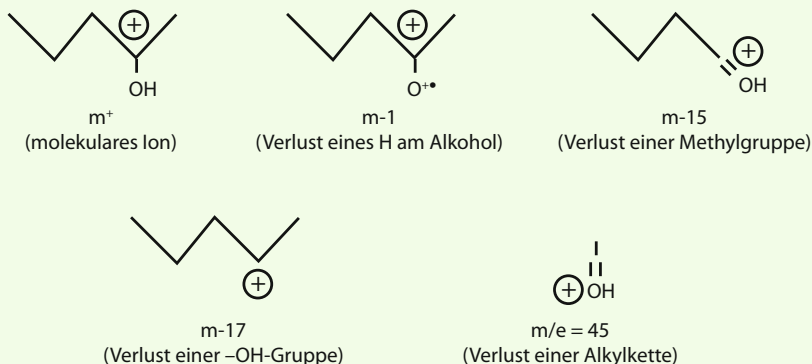
9.7 Mechanismen der vier Klassen von Endopeptidasen

a Serinproteasen spalten die Peptidbindung eines Proteins durch die Bildung einer Acyl-Enzym-Zwischenstufe. Das Serin im aktiven Zentrum bildet eine temporäre Bindung mit dem aminoterminalen Anteil des verdauten Proteins aus. **b** Cysteineproteasen ähneln den Serinproteasen, haben aber Cystein im aktiven Zentrum. **c** Die zwei Asparaginsäurereste im aktiven Zentrum von Aspartatproteasen koordinieren die Hydrolyse der Peptidbindung im Zielprotein. **d** Metalloproteasen hydrolysieren ein Zielprotein mithilfe eines Metallions wie Zn^{2+} als Cofaktor.

2-Pentanol



verschiedene Ionen

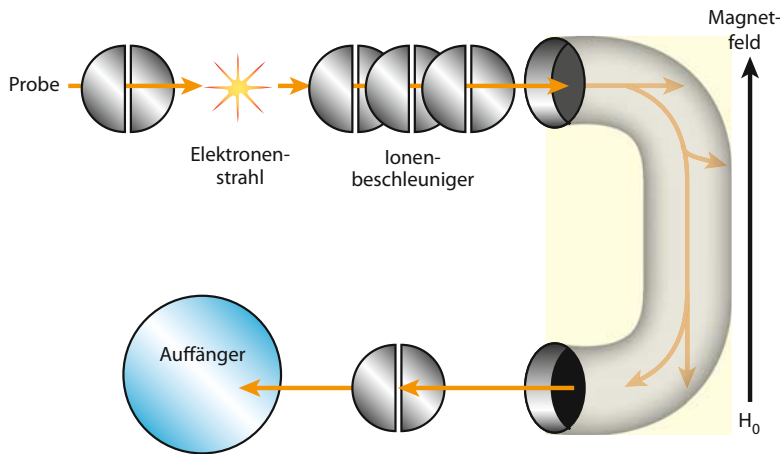


9.8 Einfache Massenspektrometrie von 2-Pentanol

Jede Substanz kann in einzelne Ionen fragmentiert werden. Dieses Beispiel zeigt die Molekülstruktur aller Ionen aus 2-Pentanol. Ein Massenspektrometer trennt diese Ionen nach ihrer Größe und zeichnet die Ergebnisse auf. Das Spektrum ist für jede Substanz immer gleich. Deshalb kann man eine unbekannte Substanz durch einen Abgleich ihres Spektrums mit den Spektren bekannter Substanzen aus einer Datenbank identifizieren.

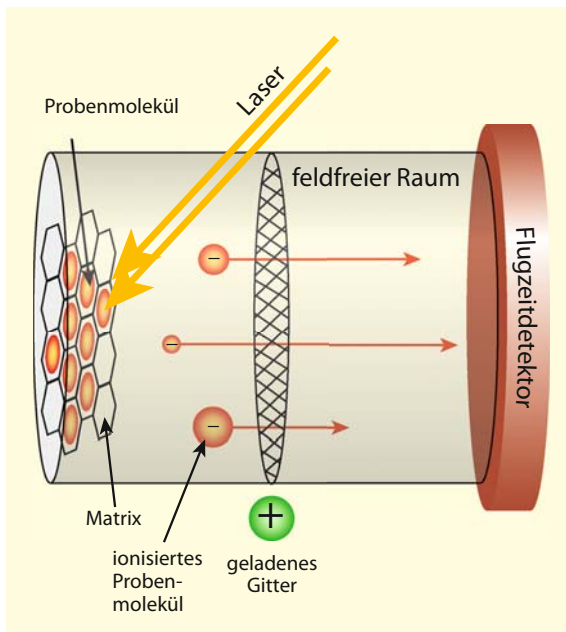
Detektor weitergeleitet. Das elektrische Feld steuert, welche Größe die Ionen besitzen, die in den Detektor gelangen. Durch eine Änderung des Feldes kann man Ionen unterschiedlicher Größe nachweisen. Es gibt auch kombinierte Detektoren, die sowohl die Flugzeit messen als auch Quadrupol-Ionenfallen verwenden.

Der Vorteil der ESI gegenüber der MALDI besteht darin, dass durch HPLC (s. weiter oben) isolierte Proteine nicht speziell aufbereitet werden müssen, sondern direkt verwendet werden können. Nachteilig an der ESI ist, dass Massen von rund 5000 das Maximum für Analysen darstellen.



9.9 Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

Die Probe tritt durch einen schmalen Spalt ein und passiert dann einen Elektronenstrahl, der sie in ein Gemisch aus Ionenfragmenten fragmentiert. Durch den Ionenbeschleuniger gelangen die Fragmente in eine C-förmige Röhre. In einem Auffänger wird gemessen, wie viel Zeit die angeregten Fragmente in der Röhre benötigen. Diese Zeit wird dann vom Computer in eine Information über die Größe und Ladung umgerechnet und auf ein Massenspektrum aufgetragen (nicht dargestellt).

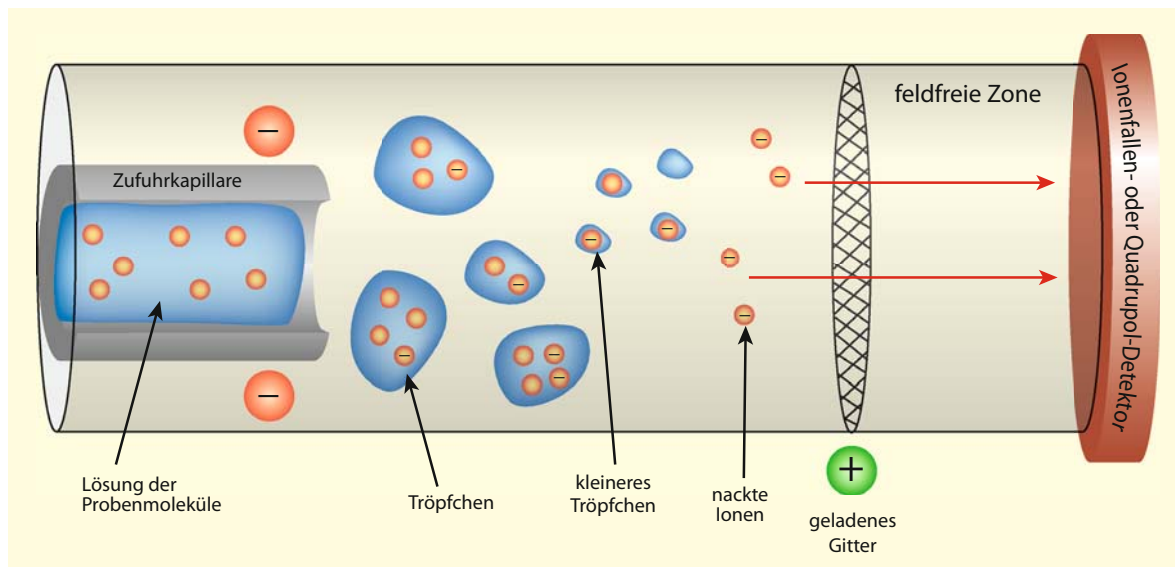


9.10 MALDI/TOF-Massenspektrometer

Mittels Massenspektrometrie kann man die Molekülmasse von Proteinen ermitteln. Dazu werden die Proteine in eine feste Matrix kristallisiert und anschließend mit Laser bestrahlt; dadurch werden Ionen aus den Proteinen herausgelöst. Diese fliegen durch eine Vakuumröhre und ein geladenes Kristallgitter und werden so nach Größe und Ladung aufgetrennt. Die Zeit bis zum Erreichen des Detektors ist proportional zur Quadratwurzel ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z). Aus den ermittelten Daten kann man dann die Molekülmasse des Proteins berechnen.

Mit weiterer Verbesserung der Techniken wird die Massenspektrometrie noch häufiger eingesetzt werden. Bei der **SELDI-Massenspektrometrie** (engl. *surface-enhanced laser desorption-ionization*) werden flüssige Proben verwendet und die Proteine ionisiert, die an einem behandelten Metallstab haften bleiben. Diese Technik scheint sehr vielversprechend für die Analyse von Körperflüssigkeiten wie Blut. Man hofft, dadurch für verschiedene Krankheiten jeweils ein spezifisches Proteinprofil identifizieren zu können. Vielleicht lässt sich auf diese Weise eines Tages Krebs diagnostizieren, bevor die Patienten Symptome zeigen. Ein verändertes Proteinprofil des Blutes könnte auf die Bildung von Krebszellen hindeuten. MALDI und ESI sind ausreichend sensitiv, um Veränderungen an Proteinen durch Phosphorylierung, Glykosylierung und so weiter nachzuweisen. Mit dieser Technik kann man feststellen, welche Aminosäure modifiziert ist, weil nur ein bestimmtes Ion verändert ist.

Bei der Massenspektrometrie wird eine Probe in kleinere Fragmente ionisiert und gemessen, wie lange diese bis zum Erreichen des Detektors benötigen. Diese Zeit korreliert mit der Größe der Ionen. Die Ionisierung von Proteinen für die Massenspektrometrie kann nach Einbettung in eine Matrix für die MALDI oder in eine Flüssigkeit für die ESI erfolgen. Bei beiden Techniken werden die Proteine nach ihrem Fragmentierungsmuster identifiziert. Mit diesen Methoden lassen sich jegliche Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung nachweisen.



9.11 Elektrosprayionisations-(ESI-)Massenspektrometer

Für die ESI-Massenspektrometrie wird eine flüssige Probe des Proteins in einer Kapillare verwendet. Durch Einwirken eines starken elektrischen Feldes werden vom Ende der Kapillare kleine Tröpfchen freigesetzt. Durch die Zuleitung von erhitztem Gas in der feldfreien Zone verdunstet das Lösungsmittel, und es werden kleine, geladene Ionen frei. Die geladenen Ionen unterscheiden sich in Größe und Ladung, und es entsteht für jedes Protein ein einzigartiges Ionenmuster. Durch ein geladenes Gitter werden die Ionen nach ihrer Größe getrennt und dadurch der Zustrom zum Detektor reguliert.

Sequenzierung von Peptiden mittels Massenspektrometrie

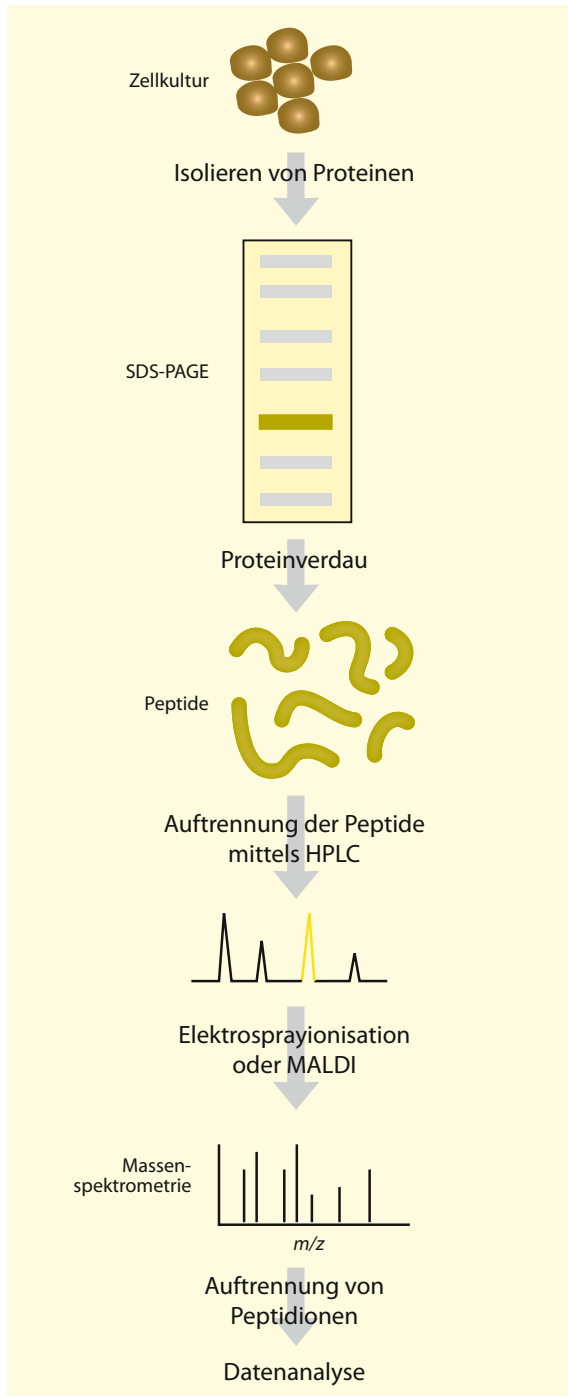
Die Peptidsequenz eines kurzen Peptids lässt sich mithilfe der derzeit verfügbaren massenspektrometrischen Techniken problemlos ermitteln (Abb. 9.12). Die Bestimmung der gesamten Sequenz eines Proteins erweist sich im Moment noch als zu kompliziert, könnte aber eines Tages ebenfalls möglich sein. Zur Sequenzbestimmung benötigt man eine reine Probe eines Proteins. Diese erhält man durch Herausschneiden eines Fleckes aus einem zweidimensionalen Gel oder durch HPLC-Reinigung. Anschließend wird das Protein mit einer Protease wie Trypsin verdaut, die Proteine auf der carboxyterminalen Seite von Arginin und Lysin spaltet. Durch das Aufspalten eines Proteins in Peptide lassen sich unerwünschte Eigenschaften des gesamten Proteins verringern.

Membranproteine sind beispielsweise hydrophob und kleben aneinander. Durch den Verdau in Peptidfragmente gehen diese Eigenschaften verloren. Auch Probleme mit der Löslichkeit lassen sich oft durch den Verdau eines Proteins in Peptide lösen. Durch

Bestimmung der Sequenz dieser Peptide erhält man letztendlich auch die Sequenz des Ausgangsproteins.

Bei der am häufigsten angewandten Methode zur Bestimmung der Peptidsequenz trennt man die Peptide zunächst mittels einer HPLC-Säule auf, die direkt mit einem Massenspektrometer gekoppelt ist. Um die Probenmenge so gering wie möglich zu halten, verwendet man als Säule eine Mikrokapillare. Als mobile Phase dient ein organisches Lösungsmittel, das die Peptide in der Reihenfolge ihrer Hydrophobie eluiert.

Aus der HPLC-Kapillare gelangen die Proben in die Kammer des Massenspektrometers. Jedes Peptid wird in zahlreiche Fragmente ionisiert (Abb. 9.13). Bei Peptiden kommen häufig zweifach protonierte Ionen vor $(M + 2H)^{2+}$, wobei M die Masse des Peptids ist und H^+ die Masse eines Protons. Die Ionenpeaks werden gegen das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetragen. Für das zweifach protonierte Peptidion wäre dies die Masse des Ions geteilt durch 2. Wenn das Ausgangspeptid beispielsweise eine Masse von 1232,55 Dalton hätte, läge die Masse des zweifach protonierten Ions bei $1232,55 \text{ Dalton} + (2 \times 1,0073)$ für jedes Wasserstoffatom. Der Peak würde bei 617,2828



9.12 Massenspektrometrie von Peptiden

Aufgrund der Sensitivität der Massenspektrometrie können große, vollständige Proteine nur begrenzt analysiert werden. Deshalb erzeugt man durch Proteaseverdau Peptidfragmente. Die Peptide kann man mittels HPLC leicht auftrennen und anschließend spezifische Peptide massenspektrometrisch analysieren.

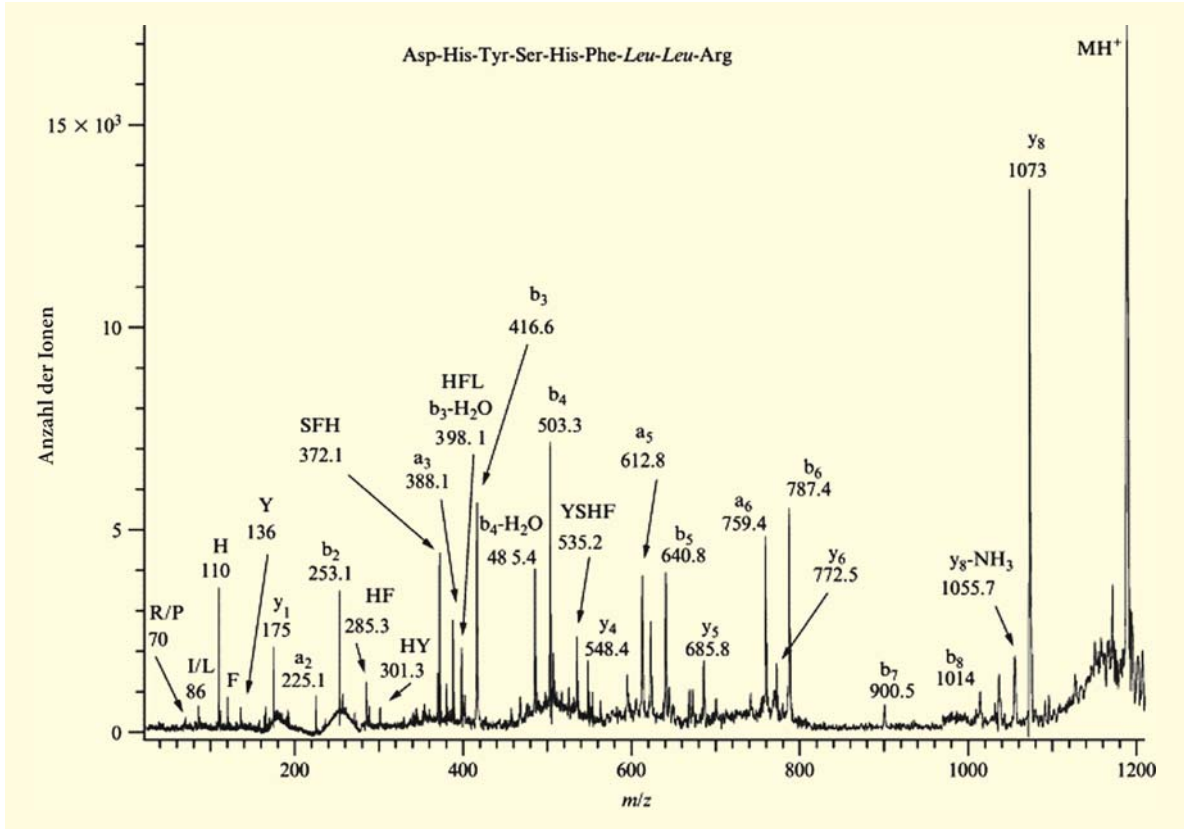
erscheinen. (Man beachte: Der Auftragungspunkt des Peaks entspricht dem Masse/Ladungs-Verhältnis; die Masse des vorliegenden Ions beträgt also 1234,5646 und die Ladung +2. Der Peak erscheint bei m/z oder $1234,5646/2$.) Bei der massenspektrometrischen Auftrennung von Peptidionen wird im ersten Schritt der Ladungszustand des Ions ermittelt. In der Regel ergeben sich für jedes Peptidion eine Reihe von Peaks. Befinden sich die Peaks in einem Abstand von 1 Dalton, so beträgt der Ladungszustand des Peptids 1. Bei einem Abstand von 0,5 Dalton zwischen den Peaks, liegt ein Ladungszustand von 2 vor.

Zur Bestimmung der Peptidsequenz werden massenspektrometrische Analysen hintereinander geschaltet. Man spricht auch von einer **Tandem-Massenspektrometrie**, weil in der ersten Runde ein Ion erzeugt wird, das dann durch Kollision mit einem Gas wie Wasserstoff, Argon oder Helium fragmentiert wird. Die Fragmente werden dann wie zuvor anhand ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses aufgetrennt. Jeder Peak variiert gewöhnlich um eine Aminosäure. Der Größenunterschied zwischen den Peaks bestimmt die Aminosäuresequenz. Bisweilen ist das Spektrum, das man für ein Peptidion erhält, nicht eindeutig. Dann zieht man zum Vergleich Datenbanken mit Peptidionenspektren heran.

Jede Aminosäure wird massenspektroskopisch in vorhersagbare Ionen zerlegt. Die Aminosäuresequenz eines unbekannten Peptids kann man durch einen Vergleich des erzeugten Ionenmusters mit bekannten Mustern ableiten.

Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Mit der Massenspektrometrie kann man auch die Menge eines bestimmten Peptids in einem Protein bestimmen; diese korreliert direkt mit der Proteinmenge (Abb. 9.14). Für einen Vergleich der relativen Mengen eines Proteins kultiviert man Zellproben unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen. Eine davon in Anwesenheit einer mit einem schweren Isotop markierten Aminosäure. Zumeist dient als schweres Isotop Deuterium (^2H), es kann aber auch ^{13}C oder ^{15}N verwendet werden. Durch diese Isotope erhöht sich



9.13 Massenspektrometrische Darstellung von Peptidfragmenten

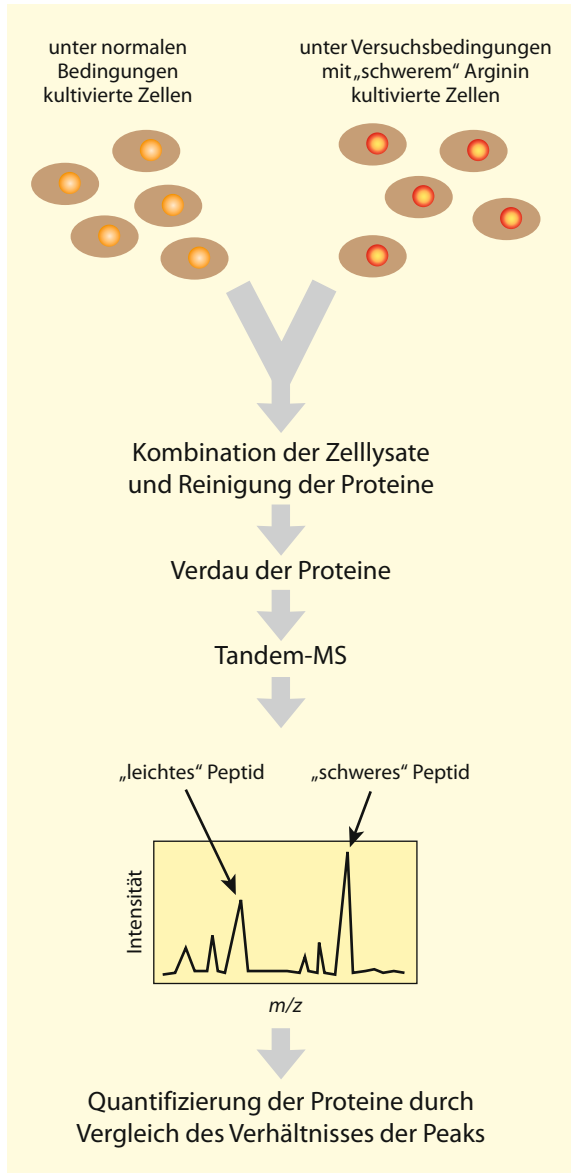
PSD-Spektrum (engl. *post-source decay*) eines tryptischen Peptids (m/z 1187,6) aus der 50 kDa-Untereinheit der DNA-Polymerase aus *Schizosaccharomyces pombe*. Das Spektrum stammt von einem Voyager-Massenspektrometer (Applied Biosystems). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung aus: Medzihradszky KF (2005). Peptide sequence analysis. *Methods Enzymol* 402: 209–244.

die Masse aller Proteine in dieser Probe. Anschließend unterzieht man die Zellen aus beiden Bedingungen einer Lyse und isoliert die Proteine. Danach werden die beiden Proben vermischt und mittels HPLC, gekoppelt mit ESI-Massenspektrometrie, analysiert. Für jedes einzelne Peptid erhält man nun zwei Peaks, einen von der normalen und einen von der schweren Probe. Das Verhältnis der beiden Peaks bestimmt die relative Veränderung der Menge des interessierenden Proteins zwischen den beiden Proben.

Durch Veränderung der Versuchsbedingungen ändert sich die Menge eines bestimmten Proteins. Diese Veränderung kann man nach Zugabe von schweren Isotopen zu einer der Proben mittels Massenspektrometrie feststellen.

Methoden zum Protein-Tagging

Die Methoden zum Protein-Tagging („Proteinmarkierung“) dienen zur Isolation und Reinigung einzelner Zielproteine aus einem Gemisch. Dazu wird das Gen für das Zielprotein genetisch mit einem DNA-Abschnitt fusioniert, der für einen „Tag“ codiert, wodurch ein Hybridgen entsteht. Dieses wird in einen Vektor mit den entsprechenden Promotoren und Terminatoren zur Expression des betreffenden markierten Proteins eingefügt. Zur Expression wird das Genkonstrukt in einen geeigneten Wirtsorganismus transformiert. Nach Kultur und Lyse der Zellen zur Freisetzung des Proteins lässt sich das Zielprotein aufgrund seines Tags leicht isolieren.



9.14 Quantifizierung von Peptiden mittels Massenspektrometrie

Mit der Massenspektrometrie kann man die Menge eines bestimmten Proteins in Proben unter zwei verschiedenen Bedingungen vergleichen. Die Zellen unter der ersten Bedingung werden zusammen mit einer „schweren“ Aminosäure wie Arginin kultiviert, die während der Proteinsynthese eingebaut wird. Mithilfe von Proteasen werden die Proteine in kleine Peptidfragmente verdaut und diese dann mittels ESI-Massenspektrometrie ionisiert. Durch die Analyse erhält man für jedes Peptid Paare aus leichten und schweren Peaks. Die Größe der Peaks korreliert mit der Menge des Peptids bzw. Proteins. In diesem Beispiel ist der „schwere“ Peak häufiger, also ist dieses Protein unter den Versuchsbedingungen in größerer Menge vorhanden.

Für die Isolierung von Proteinen finden viele verschiedene Tags Verwendung, denn die chemischen Eigenschaften und die Größe des Tags können das interessierende Protein auf negative Weise beeinflussen. Der erste weithin verwendete Tag, der sogenannte **Polyhistidin-** oder **His6-Tag**, besteht aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten (Abb. 9.15). Histidin bindet sehr fest an Nickelionen. Deshalb reinigt man mit dem His-Tag markierte Proteine in einer Säule, an die Ni^{2+} -Ionen gebunden sind. Haben die His6-markierten Proteine an die Säule gebunden, werden sie durch Aufbrechen der Ni^{2+} -His-Wechselwirkung mit freiem Histidin oder Imidazol entfernt. Der Polyhistidin-Tag kann an das carboxy- oder an das aminoterminal Ende des betreffenden Proteins angehängt werden. Aufgrund der Kürze des His6-Tags wird das Zielprotein durch dessen Addition kaum beeinflusst.

Ein weiterer kurzer Tag für Proteine ist beispielsweise der FLAG-Tag, der von einem spezifischen Antikörper erkannt wird. FLAG hat die Aminosäuresequenz Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys. Wie zuvor beschrieben, wird das Gen für das Zielprotein zusammen mit einem kurzen DNA-Abschnitt, der für FLAG codiert, in einen Vektor kloniert; das Hybridprotein wird entweder in Bakterien oder in einer Zelllinie produziert. Mit dem FLAG-Tag markierte Proteine können mit dem Anti-FLAG-Antikörper, gebunden an Kügelchen oder eine Säule, aus dem Zelllysat isoliert werden. Nur mit dem Tag markiertes Protein bindet an die Kügelchen, beziehungsweise an die Säule. Durch Hinzufügen von freiem FLAG-Peptid wird das FLAG-markierte Protein schließlich wieder von dem Antikörper getrennt. Das kurze Peptid ist im Überschuss vorhanden und konkurriert mit dem markierten Protein um den Antikörper; deshalb wird Letzteres wieder von den Kügelchen oder von der Säule eluiert.

Ein weiterer kurzer Tag ist der „Strep“-Tag. Diesen liefert ein kurzer DNA-Abschnitt, der für ein Peptid aus zehn Aminosäuren mit einer ähnlichen Struktur wie Biotin codiert (s. Kap. 3). Das biotinähnliche Peptid bindet fest an Avidin und Streptavidin, weshalb man Proteine mit Strep-Tags durch Bindung an Streptavidinsäulen oder -kügelchen isoliert.

Neben den kurzen Tags werden für bestimmte Anwendungen auch längere Tags verwendet, die aus ganzen Proteinen bestehen. Drei häufig verwendete Tags sind beispielsweise **Protein A** aus *Staphylococcus*, **Glutathion-S-Transferase (GST)** aus *Schistosoma japonicum* und **Maltose-bindendes Protein (MBP)** aus *Escherichia coli*. Genau wie bei den kurzen

Exkurs 9.1

Proteom-Muster-Diagnostik

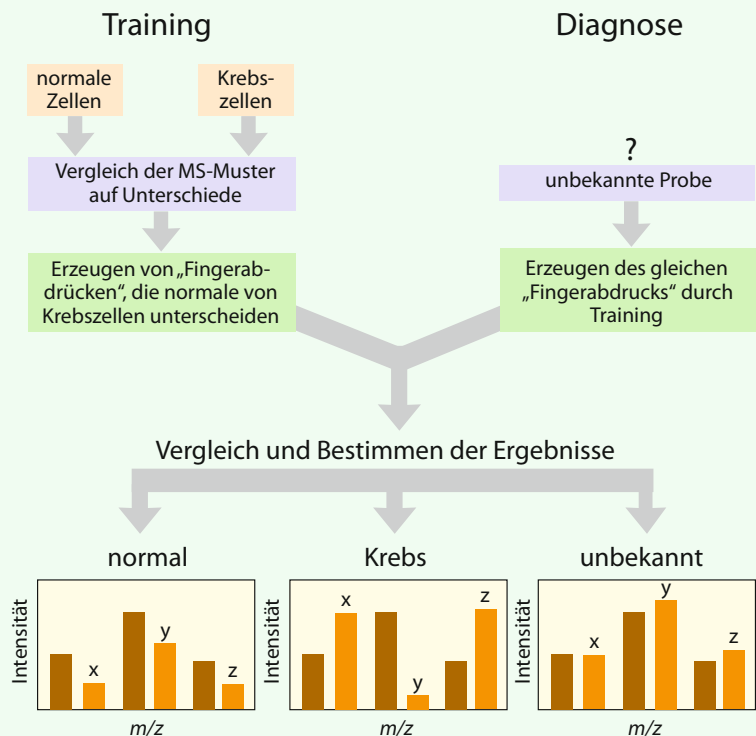
Da Massenspektren sehr sensitiv auf geringfügige Variationen in Proteinproben reagieren, kann man sie potenziell zur Diagnose von Krankheiten einsetzen. Zu den Anwendungsmöglichkeiten gehört beispielsweise, ob eine Serumproteinprobe eines Patienten krankhaft oder normal ist. Um solche Messungen zu standardisieren, muss man zunächst Profile für den Normalzustand und den Erkrankungszustand erstellen. So kann man z.B. Blutserumproben von gesunden Frauen und von Patientinnen mit Eierstockkrebs nehmen und diese massenspektrometrisch untersuchen. Per Computer können die Daten beider Spektren analysiert werden. Aufgrund der Komplexität der Muster werden jedoch tatsächlich jeweils nur Teile der Spektren einer Analyse unterzogen. Zunächst erstellt der Computer aus jedem Spektrum verschiedene „Datenpakete“, die nur fünf bis zwanzig verschiedene Proteine umfassen. Diese Datenpakete werden dann verglichen, um herauszufinden, welche sich bei den normalen Proben und denen der Krebspatientinnen unterscheiden. Die besten Datenpakete werden behalten, die übrigen ignoriert. Diese Form des „Computertrainings“ beruht auf einem **Selektionsdruck**, der auf die künstliche Intelligenz wirkt. Durch Beschränkung der Computeranalyse auf die Unterschiede zwischen den normalen und den Krebspektren ergibt sich eine ständige Verfeinerung.

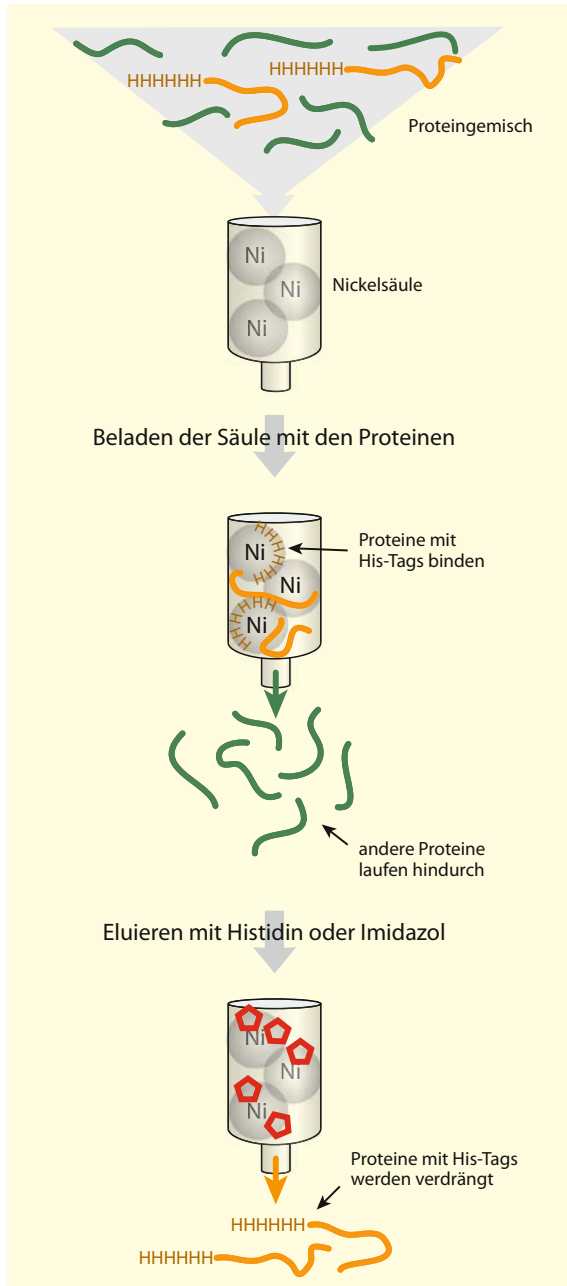
Nach entsprechendem Training des Computers können weitere Patientinnen durch massenspektrometrische Untersuchung einer Blutserumprobe auf Eierstockkrebs untersucht werden. Der Computer stellt dann fest, ob das Serum der neuen Patientin ein normales, ein für Krebs typisches oder ein bislang unbekanntes Spektrum erzeugt (Abb.).

Der größte Nachteil bei derartigen Analysen ist, dass die Identität der Proteinpeaks nicht bekannt ist. Daher muss man sehr aufpassen, dass die Peaks tatsächlich Tumormarker repräsentieren und nicht andere Unterschiede. So können unterschiedliche Profile auch mit Alter, Geschlecht, Bewegung, Menopause, Ernährungsgewohnheiten, Arzneimittelaufnahme und so weiter in Zusammenhang stehen. Auch die Aufbewahrung und Behandlung der Proben kann sich auf die Profile auswirken; so beeinflusst beispielsweise längeres Einfrieren bzw. Auftauen die Proteine. Weiterhin sollte man darauf achten, dass das Massenspektrometer bei allen Proben gleich funktioniert und dass die Proben der Patienten auf die gleiche Weise genommen und verarbeitet werden. Unter Beachtung all dieser Faktoren könnte sich die Protein-Muster-Diagnostik zu einer sehr effektiven Methode entwickeln, mit der sich verschiedene Krankheiten noch vor Eintreten offensichtlicher Symptome nachweisen lassen.

Protein-Muster-Diagnostik

Durch Computertraining lässt man einen Computer Untergruppen von Massenspektren bilden, die unter zwei verschiedenen Bedingungen Unterschiede aufweisen. So werden beispielsweise Massenspektren von Krebszellen und normalen Zellen analysiert, um Proteine zu finden, die nur bei Krebs abweichen. Für zuverlässige Ergebnisse muss eine große Zahl von Proben analysiert werden. Hat der Computer einen „Fingerabdruck“ für Krebs generiert, können auf diese Weise auch unbekannte Proben auf normale, unbekannte oder Krebs-Fingerabdrücke untersucht werden. In diesem Beispiel sind X, Y und Z die einzigen Proteine, die sich bei Krebs verändern. Die Menge von X und Z nimmt zu, während die von Y abnimmt. Bei dem unbekannten Zustand nehmen sowohl X, Y als auch Z zu. Er stimmt damit nicht mit dem eigentlichen Krebsprofil überein.





9.15 Nickelreinigung von His6-markierten Proteinen

Um eine reine Probe eines spezifischen Proteins zu isolieren, wird das Gen für das Protein genetisch mit einem Abschnitt verbunden, der für sechs Histidinreste codiert. Das exprimierte Fusionsprotein kann aufgrund der chemischen Eigenschaften der Histidine aus einem Proteingemisch isoliert werden. Die Histidine binden an mit Nickel überzogene Kügelchen, die übrigen nichtmarkierten Proteine laufen durch die Säule hindurch. Das Protein mit den His-Tags wird anschließend mithilfe von freiem Histidin oder Imidazol aus der Säule eluiert.

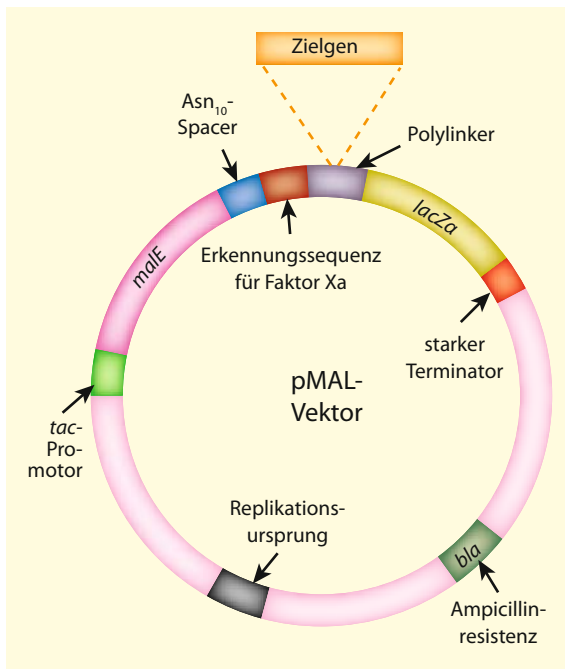
Tags werden auch die Gene für diese längeren Tags genetisch mit dem Zielgen fusioniert, und das Hybridgenkonstrukt wird mithilfe entsprechender Transkriptionspromotoren und -terminatoren exprimiert. Haben die Wirtszellen das Hybridgen exprimiert, kann man das Fusionsprotein durch Reinigung des Protein-Tags isolieren. Für die Bindung von Protein A gibt es einen spezifischen Antikörper; durch Absenken des pH-Wertes wird das Fusionsprotein freigesetzt. MBP bindet an Maltose (gebunden an Kügelchen oder eine Säule), und das Fusionsprotein wird durch Zugabe von freier Maltose abgelöst. GST bindet an sein Substrat Glutathion (ebenfalls an Kügelchen oder eine Säule), und auch hier erfolgt die Ablösung des Hybridproteins mit dem freien Substrat. Nach der Isolierung muss man das Fusionsprotein spalten, um das Zielprotein von dem markierten Protein zu trennen.

Zu den nützlichen Eigenschaften der längeren Tags gehört das Vorhandensein von Spaltungsstellen für Proteasen zwischen dem Zielprotein und dem markierten Protein. Der Vektor für pMAL (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA) enthält das Gen für MBP, gefolgt von einer Spacer-Region, einer Erkennungssequenz für Faktor Xa und schließlich die Polylinker-Region für die Klonierung des Zielgens (Abb. 9.16). Bei Faktor Xa handelt es sich um eine spezifische Protease, die vom Blutgerinnungssystem genutzt wird. Durch Insertion seiner Erkennungssequenz kann der MBP-Anteil des Hybridproteins vom Zielprotein abgespalten werden. Nach Elution des Hybridproteins von der Säule mit Maltose wird das Ausgangsprotein durch Proteasebehandlung isoliert. Besonders nützlich ist dies, wenn man für eine Analyse reines natives Protein benötigt.

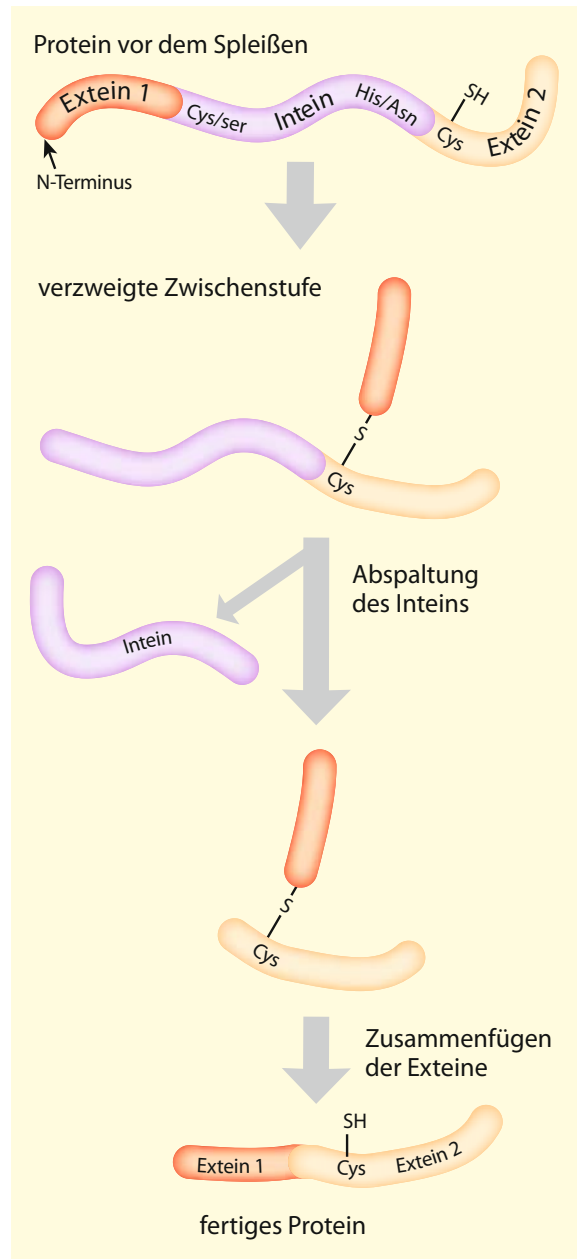
Eine noch einfachere Möglichkeit, eine reine Probe eines nativen Proteins zu erhalten, bietet der **Intein**-Tag, der sich selbst herausschneiden kann. Grundlage dieser Methode bilden die Inteine, in einigen Proteinen vorkommende, zum Selbstspalten fähige intervenierende Segmente. Inteine sind bei Proteinen die Äquivalente zu den Introns der RNA. Das Intein schneidet sich über eine verzweigte Zwischenstufe selbst aus seinem Wirtspolypeptid heraus (Abb. 9.17).

Das sogenannte **IMPACT-System** (engl. *Intein Mediated Purification with Affinity Chitin-binding Tag*) von New England Biolabs zur Intein-vermittelten Reinigung verwendet ein modifiziertes Intein des *VMA1*-Gens von *Saccharomyces cerevisiae*. Hierbei wird das Zielprotein nach Reinigung des Fusionsproteins durch Inteinspaltung freigesetzt (Abb. 9.18). Dieses Hefe-Intein spaltete ursprünglich sowohl an

seinem N-Terminus als auch am C-Terminus, wurde aber so modifiziert, dass es nur noch am N-Terminus spaltet. Der Chitinbindungs-Tag dieses Systems ist die kleine Chitin-bindende Domäne (CBD) des Chitinasase-A1-Gens von *Bacillus circulans*. (Chitin ist die Substanz, aus der das harte Außenskelett von Insekten besteht.) Der Vektor enthält einen Polylinker oder eine Klonierungsstelle für das Zielgen, gefolgt von dem DNA-Abschnitt, der für das Intein codiert und der CBD. Das Fusionsprotein wird exprimiert und das Zelllysate, welches das Hybridprotein enthält, isoliert. Beim Durchlaufen einer Chitinsäule bindet das Hybridprotein über die CBD an die Säule, und die übrigen zellulären Proteine eluieren. Anschließend wird die Säule bei 4 °C mit Dithiothreitol (DTT) inkubiert, einem Thiolreagens, welches das Intein zur Abspaltung seines N-Terminus aktiviert. Auf diese Weise wird das Zielprotein von der Säule abgelöst, und es bleiben das Intein und die CBD-Abschnitte zurück.

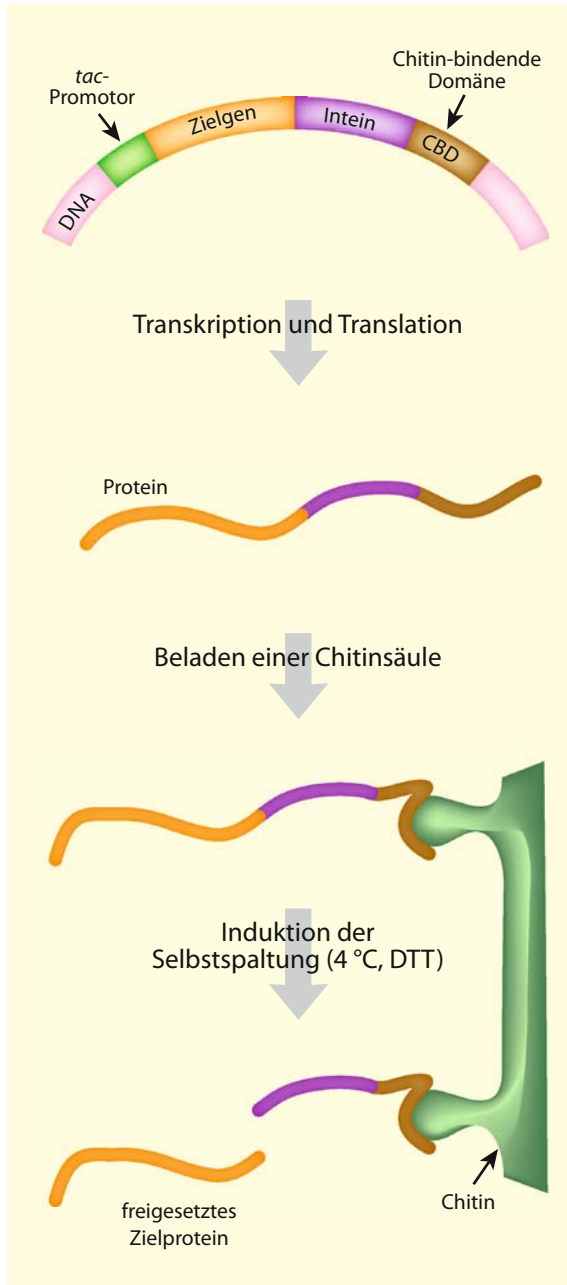


9.16 Fusionsvektor für Maltose-bindendes Protein
Vektoren wie pMAL weisen Polylinker-Regionen auf, um das Zielgen „in frame“ mit dem Gen für ein markiertes Protein (z.B. das *malE*-Gen) zu klonieren. Da MBP an Maltosesäulen bindet, kann das Fusionsprotein leicht isoliert werden. Das Fusionsprotein enthält auch eine Bindungsstelle für die Protease Faktor Xa. Ist das Fusionsprotein an die Säule gebunden, setzt Faktor Xa das Zielprotein frei und lässt die MBP-Domäne zurück.



9.17 Mechanismus des Herausschneidens von Inteinen

Das intervenierende Inteinsegment schneidet sich in zwei Stufen selbst aus dem Protein heraus. Das Intein enthält einen Cys- oder Ser-Rest an der Grenze zu Extein 1 und eine basische Aminosäure an der Grenze zu Extein 2. Das Extein strangabwärts (2) hat an der Spleißstelle einen Cys-Rest. Extein 1 wird abgeschnitten und an die Schwefelkette des Cysteinrestes an der Spleißstelle angehängt. Dadurch bildet sich vorübergehend eine verzweigte Zwischenstufe. Anschließend wird das Intein herausgeschnitten und eliminiert, und die beiden Exteine verbinden sich zum endgültigen Protein.



9.18 Das IMPACT-System zur Intein-vermittelten Reinigung

Inteine, die sich an ihrem N-Terminus selbst heraus-schneiden können, machen es möglich, dass spezifische Proteine in einem Schritt gereinigt und von einem Fusionsprotein abgespalten werden können. Zunächst reinigt man das Fusionsprotein mithilfe einer Chitinsäule. (Man beachte: Die CBD oder Chitin-bindende Domäne erkennt und bindet das Chitinmolekül.) Die Säule wird mit DTT in einem Kühlschrank inkubiert. Das Intein spaltet sich an seinem Aminoterminus ab und setzt das Zielprotein frei.

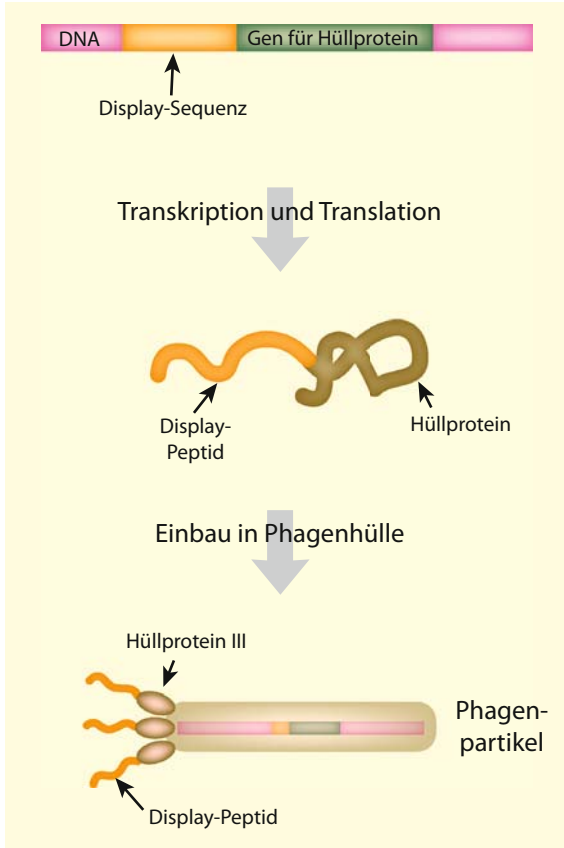
Als Protein-Tags dienen entweder kurze Peptide oder ganze Gene, die mit einem interessierenden Protein fusioniert werden. Mithilfe von Protein-Tags kann man ein interessierendes Protein von den übrigen zellulären Proteinen isolieren.

Phagen-Display-Bibliotheken

Eine **Phagen-Display**-Bibliothek ist eine Sammlung von Bakteriophagenpartikeln, die auf ihrer Oberfläche Abschnitte von Fremdproteinen tragen (Abb. 9.19). Die Außenhülle normaler Bakteriophagen besteht aus Proteinen. Die Hülle des Bakteriophagen M13 besteht beispielsweise aus rund 2500 Kopien des Hüllproteins von Gen VIII („*major coat protein*“) und etwa fünf Kopien des Proteins von Gen III („*minor coat protein*“). Ein bestimmtes Phagen-Display-System bewirkt die Fusion von Gen-III-Proteinen an das Fremdprotein, sodass M13 danach fünf Kopien des Fremdproteins auf seiner Oberfläche trägt. M13 bewirkt nicht die Lyse der von ihm infizierten Bakterien und eignet sich insofern gut. Die Virenpartikel werden einfach durch die Bakterienzellhülle nach außen freigesetzt.

Voraussetzung für das Display eines Fremdproteins auf einem Phagen ist eine Fusion des Gens für dieses Protein mit Gen III, wodurch ein Hybridprotein entsteht. Damit es richtig exprimiert wird, muss die Insertion des interessierenden Gens „*in frame*“ – also ohne Beeinträchtigung des Leserasters von Gen III – erfolgen. Das M13-Genom kann die zusätzliche DNA aufnehmen, weil die Bakteriophagenpartikel filamentös sind und zur Aufnahme eines größeren Genoms einfach verlängert werden. Nun wird das M13-Genom mit dem darin enthaltenen interessierenden Gen in *E. coli* transformiert. Dort bewirkt die Bakteriophagen-DNA die Synthese neuer Partikel, die das interessierende Protein in der Hülle exprimieren.

Auch ein Display kleiner Genabschnitte ist bei Bakteriophagen möglich. So kann man beispielsweise willkürliche, durch PCR erzeugte Oligonucleotide klonieren und mit dem Gen III von M13 fusionieren. Jedes dieser zufälligen Oligonucleotide codiert für ein anderes Peptid. Diese Klone werden dann in den Bakteriophagen transformiert. Jeder Transformand exprimiert daraufhin sein Fremdprotein fusioniert mit dem Protein von Gen III.



9.19 Prinzip eines Phagen-Displays

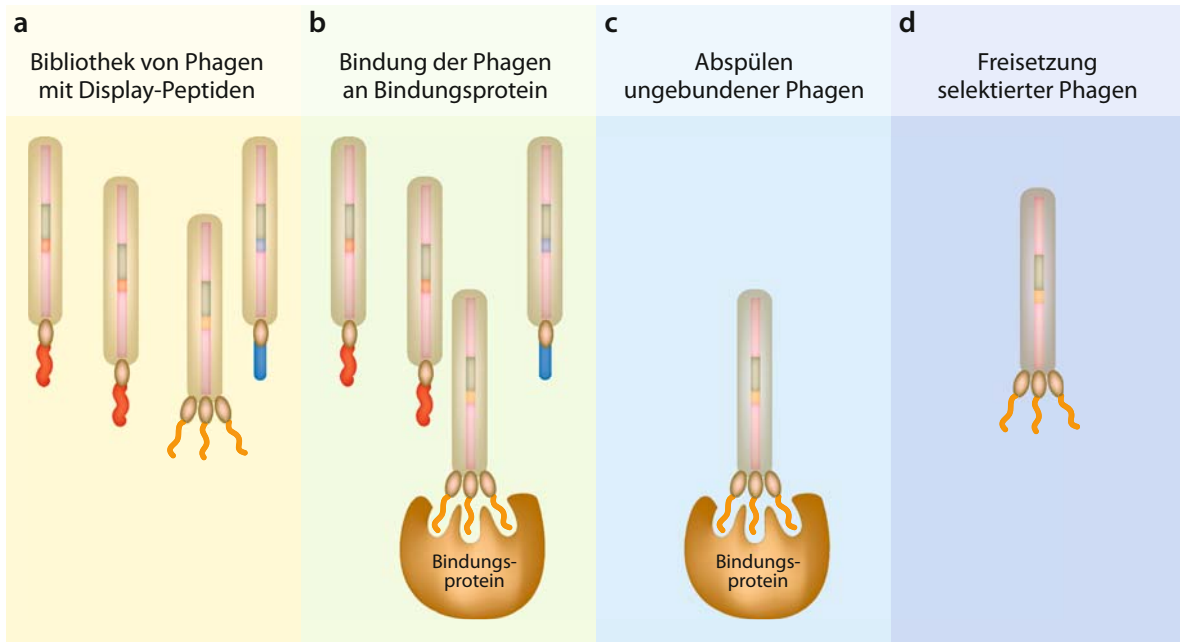
Für das Display eines Peptids auf der Oberfläche eines Bakteriophagen muss die für dieses Peptid codierende DNA mit dem Gen für ein Hüllprotein des Bakteriophagen fusioniert werden. In diesem Beispiel wird das gewählte Hüllprotein durch das Gen III des Phagen M13 codiert. Der N-terminale Abschnitt des Gen-III-Proteins befindet sich außerhalb des Phagenpartikels, der C-terminale Abschnitt hingegen innerhalb. Daher muss die Fusion des Peptidgens „in frame“ am N-Terminus erfolgen, damit es an der Außenseite des Phagen exprimiert wird.

Die Sammlung von Display-Peptiden kann auf vielfältige Weise von Nutzen sein. Mit der Screening-Methode des sogenannten **Biopanning** kann man ein bestimmtes Ziel finden, etwa eine spezifische Proteinbindungsdomäne oder ein spezifisches Peptid, das an einen Antikörper bindet (Abb. 9.20). Beim Biopanning wird die Bibliothek der Phagen, die das Fremdprotein exprimieren, zusammen mit dem Ziel inkubiert, etwa einem Antikörper, der an ein Kügelchen oder eine Membran gebunden ist.

Sämtliche rekombinanten Phagen, die an diesen Antikörper binden, bleiben an dem festen Träger haften, die übrigen werden gewaschen. Alle gebundenen Phagen werden eluiert und für die Replikation des Phagen mit *E. coli* inkubiert. In der Regel wiederholt man diesen Vorgang, um spezifisch bindende Peptide anzureichern, denn es kann auch zu einigen unspezifischen Bindungen kommen. Ist ein Phage mit einem nützlichen Peptid identifiziert, kann man den Klon sequenzieren und so die Struktur des Peptids ermitteln.

Bibliotheken unfragmentierter Proteine können ebenfalls mittels Phagen-Display untersucht werden, bereiten aber einige zusätzliche Probleme. Die codierenden Sequenzen für ganze Proteine müssen „in frame“ mit der Signalsequenz am N-terminalen Ende wie auch mit Gen III am C-terminalen Ende kloniert werden. (Die Signalsequenz ist erforderlich, um das Hybridprotein zur Virenhülle zu dirigieren.) Das korrekte Leseraster zu gewährleisten, ist für ein oder zwei Gene vertretbar, bei einer gesamten Bibliothek besteht jedoch viel zu viel Raum für Fehler. Zudem kann an einer der Fusionsstellen auch ein Stoppcodon entstehen und verhindern, dass das Hybridprotein überhaupt exprimiert wird. Gelöst hat man dieses Problem, indem man für Bibliotheken ganzer Proteine den Bakteriophagen T7 verwendet. Bei T7 liegt der C-Terminus des Hüllproteins frei auf der Außenseite. Für eine Expression auf der Phagenoberfläche muss die Proteinbibliothek daher mit dem C-Terminus des Hüllproteins fusioniert werden. Dazu ist nur eine Fusionsstelle erforderlich. Außerdem bleibt das Hüllprotein selbst unbeeinflusst und wird normal synthetisiert, wenn die Bibliothekssequenzen außerhalb des Leserasters kloniert werden oder Stoppcodons enthalten; das angehängte Bibliotheksprotein ist in diesem Fall allerdings defekt.

Für die Proteomforschung bietet es große Vorteile, dass man auf diese Weise gesamte Proteine für ein Biopanning exprimieren kann. Um ein Protein zu identifizieren, das an einen bestimmten Zelloberflächenrezeptor bindet, kann man eine Phagen-Display-Bibliothek einem Biopanning auf Rezeptorbindung unterziehen. Ein weiteres Beispiel ist das Auffinden RNA-bindender Proteine. Hierfür wird die RNA an einem festen Träger verankert und die Phagen-Display-Bibliothek mit diesem RNA-„Köder“ inkubiert. Die Phagen, die an den RNA-Köder binden, werden isoliert und durch Wiederholung der gesamten Prozedur angereichert. Anschließend kann man jeden isolierten Klon sequenzieren und herausfinden, welche Proteine die RNA binden.



9.20 Biopanning eines Phagen-Displays

Mit dem sogenannten Biopanning kann man Peptide isolieren, die an ein spezifisches Zielprotein binden, das gewöhnlich an einen festen Träger wie eine Membran oder ein Kügelchen gebunden ist. Die Phagen-Display-Bibliothek (**a**) wird an das Bindungsprotein gebunden (**b**). Phagen, die das Zielprotein binden, werden zurückgehalten (**c**), die anderen werden abgspült. Phagen, die das Bindungsprotein erkennen, können freigesetzt, isoliert und gereinigt werden.

Bei der Technik des Phagen-Displays werden Fremdproteine oder -peptide an ein Hüllprotein an der Oberfläche eines Phagen fusioniert. Durch dieses „Display“ an der Oberfläche des Phagen können sie analysiert werden.

Mithilfe des Biopannings kann man Bindungspartner eines interessierenden Proteins identifizieren. Dazu wird das betreffende Protein zusammen mit einer Phagen-Display-Bibliothek inkubiert. Bindet ein Phage an das Protein, kann man ihn isolieren und die Sequenz des Display-Peptids ermitteln.

spricht man vom **Protein-Interaktom**. Hormone beispielsweise binden in der Regel an Rezeptoren, die das Signal weiterleiten. Oft sind dafür mehrere Proteine hintereinandergeschaltet, wobei ein Protein ein anderes aktiviert und dieses wiederum ein anderes. Wollen Wissenschaftler die Funktion von Hormonen verstehen, müssen sie sämtliche Proteine der Signalkaskade identifizieren. Eine Möglichkeit, solche Wechselwirkungen zu identifizieren, bietet das Phagen-Display. Es kann allerdings vorkommen, dass die Display-Proteine sich nicht korrekt falten oder bestimmte Cofaktoren fehlen, wenn Säugetierproteine von Bakterien exprimiert werden.

Überwinden lassen sich diese Probleme zum Beispiel mit der Methode des **yeast two hybrid-Systems** (Hefe-Zwei-Hybrid-Systems). Hierbei wird durch die Bindung zweier Proteine ein Reportergen aktiviert. Durch die Bindung des Transkriptionsaktivators GAL4 an die Promotor-Region des Reportergens wird dessen Transkription und Translation aktiviert. GAL 4 enthält zwei zum Anschalten des Reportergens erforderliche Domänen. Die DNA-bindende Domäne (DBD) erkennt das Promotorelement und

Protein-Protein-Interaktionen: Das *yeast two hybrid*-System

Neben der Funktions- und Expressionsanalyse von Proteinen versucht die Proteomik auch, wichtige Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu finden. Auch hier gibt es wieder eine Terminologie: Als Überbegriff für alle Protein-Protein-Interaktionen

positioniert die zweite Domäne, die Aktivierungsdomäne (AD), in der Nähe der RNA-Polymerase, wo sie die Transkription aktiviert. Diese beiden Domänen lassen sich als separate Proteine exprimieren – sie können das Reportergen aber erst dann aktivieren, nachdem sie zusammengebracht wurden (Abb. 9.21).

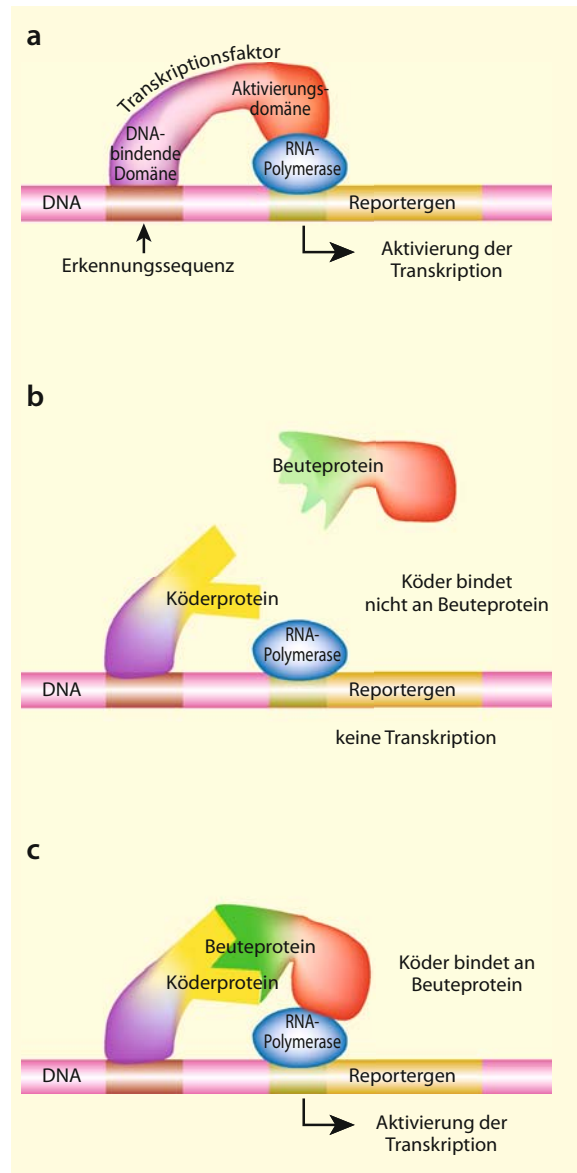
Beim Two-Hybrid-System werden die beiden Domänen jeweils mit verschiedenen Proteinen fusioniert, indem Hybridgene erzeugt werden. Das **Köderprotein** (engl. *bait*) ist die DBD, die genetisch mit dem interessierenden Protein fusioniert wird. Das **Beuteprotein** (engl. *prey*) ist die AD. Sie ist mit Proteinen fusioniert, welche auf Interaktionen mit dem Köder untersucht werden. Binden Köder- und Beuteprotein aneinander, aktivieren die DBD und AD die Transkription des Reportergens.

Zur Durchführung einer Two-Hybrid-Analyse benötigt man zwei Vektoren (Abb. 9.22). Der erste Vektor hat eine multiple Klonierungsstelle oder Polylinker (MCS; engl. *multiple cloning site*) für das Köderprotein in 3'-Richtung der GAL4-DBD; daher hat das Fusionsprotein das Köderprotein als C-terminale Domäne. Der zweite Vektor enthält eine multiple Klonierungsstelle für das Beuteprotein in 5'-Richtung der GAL4-AD, und das Fusionsprotein hat das Beuteprotein als N-terminale Domäne. Beide Plasmide müssen in derselben Hefezelle exprimiert werden. Wenn Köder- und Beuteprotein interagieren, wird das Reportergen angeschaltet.

Das Reportergen muss so konstruiert werden, dass es unter der Kontrolle der GAL4-Erkennungssequenz steht. Zu den häufig verwendeten Reportergenen gehören *HIS3*, das für ein Enzym der Histidinsynthese codiert und dessen Expression es den Hefezellen ermöglicht, auch auf Medien ohne Histidin zu wachsen, oder *URA3*, das ein Wachstum ohne Uracil möglich macht. Diese Reportersysteme benötigen Hefewirtszellen, bei denen die entsprechenden Gene defekt sind. Sie ermöglichen jedoch eine direkte Selektion positiver Isolate.

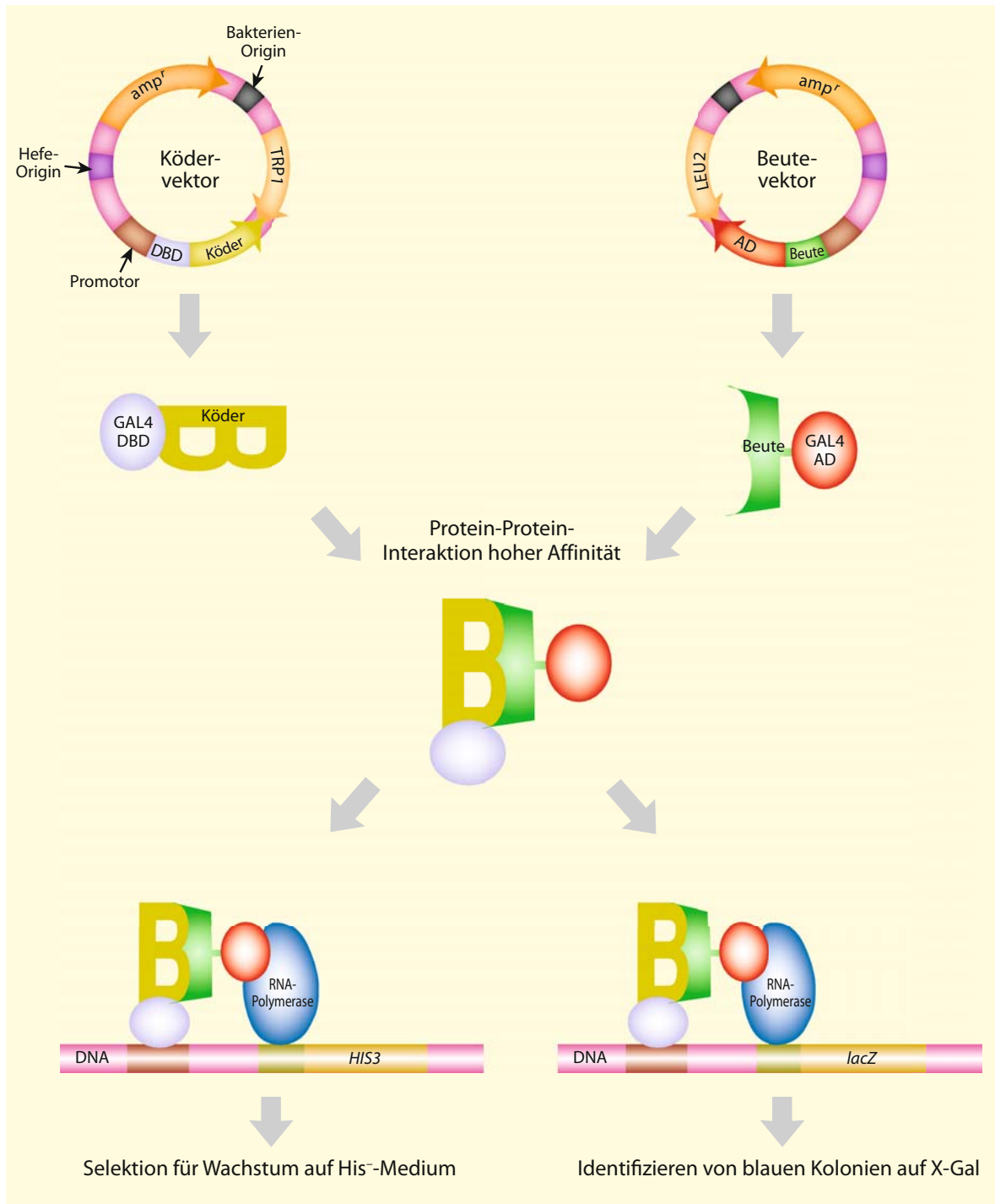
Ein weiterer Reporter ist *lacZ* aus *E. coli*, das für β -Galactosidase codiert. Sowohl Bakterien als auch Hefe, die *lacZ* exprimieren, färben sich blau, wenn man sie mit X-Gal kultiviert. β -Galactosidase spaltet X-Gal und setzt dabei ein blaues Produkt frei. Gewöhnlich werden die Reportergene in das Hefegenom integriert und befinden sich nicht auf einem separaten Vektor.

Mithilfe des *yeast two hybrid*-Systems hat man sämtliche Protein-Protein-Interaktionen im Hefeproteom identifiziert und zwar durch ein Massenscreening-Verfahren, dem sogenannten „Mating“



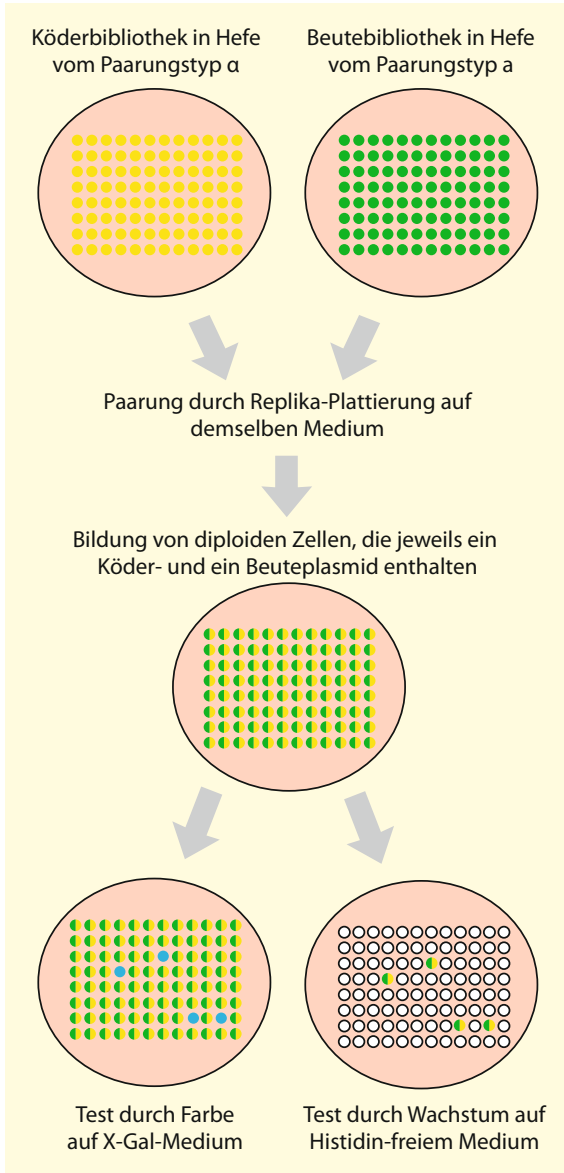
9.21 Das Prinzip der Two-Hybrid-Technik

Bei Analyse (a) haben die Hefe-Transkriptionsfaktoren zwei Domänen: die DBD (violett) erkennt Regulationssequenzen auf der DNA, die AD (rot) aktiviert die RNA-Polymerase, mit der Transkription des Reportergens zu beginnen. Für die Two-Hybrid-Analyse werden zwei Proteine, das „Köderprotein“ und das „Beuteprotein“ (engl. *bait* und *prey*), getrennt mit den Domänen DBD und AD des Transkriptionsfaktors fusioniert. Das Köderprotein wird an die DBD gebunden, das Beuteprotein an die AD. **b** Köder- und Beuteprotein interagieren nicht, und das Reportergen wird nicht angeschaltet. **c** Das Köderprotein bindet an das Beuteprotein und bringt so die beiden Hälften des Transkriptionsfaktors zusammen. Der Komplex aktiviert die RNA-Polymerase, und das Reportergen wird exprimiert.



9.22 Vektoren für die Two-Hybrid-Analyse

Für eine Two-Hybrid-Analyse sind zwei verschiedene Vektoren erforderlich. Der Ködervektor enthält codierende Regionen für die DBD und das Köderprotein. Der Beutevektor enthält codierende Abschnitte für die AD und das Beuteprotein. Die beiden unterschiedlichen Konstrukte werden in derselben Hefezelle exprimiert. Bei einer Interaktion von Köder- und Beuteprotein wird das Reportergen exprimiert. Zwei Reportersysteme sind hier dargestellt. Das *His3*-Gen ermöglicht der Hefe, auf Histi-din-freien Medien zu wachsen. Das *lacZ*-Gen codiert für β -Galactosidase, die X-Gal spaltet und einen blauen Farbstoff bildet.



9.23 Two-Hybrid-Analyse: Massen-Screening nach Paarungstyp

Um mithilfe des Two-Hybrid-Systems sämtliche möglichen Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren, wird haploide α -Hefe mit der Köderbibliothek fusioniert, und haploide a -Hefe mit der Beutebibliothek. Werden die beiden Hefetypen miteinander verpaart, so enthalten die diploiden Zellen jeweils ein einzelnes Köderfusionsprotein und ein einzelnes Beutefusionsprotein. Interagieren die beiden Proteine, so aktivieren sie das Reportergen, welches es ermöglicht, dass die Hefe auf Medien ohne Histidin wachsen kann (Hefe-*His3*-Gen); oder sie färben die Zelle blau, wenn sie auf X-Gal-Medium wachsen (*lacZ* aus *E. coli*). Mittels automatisierter Techniken kann dieser Prozess für alle 6000 vorhergesagten Hefeproteine wiederholt werden.

(Abb. 9.23). Hefe besitzt rund 6000 verschiedene Proteine. Jedes davon wurde mittels PCR in beide Vektoren kloniert. Auf diese Weise kann jedes Protein sowohl als Köder als auch als Beute dienen. Sämtliche Ködervektoren wurden in haploide Hefe eines Paarungstyps transformiert, die Beutevektoren in die des anderen Paarungstyps. Haploide Zellen mit Köder werden mit haploiden Zellen mit Beute fusioniert und die daraus entstehenden diploiden Zellen auf Reportergenaktivität hin analysiert. Bei dieser Analyse wurden also 6000×6000 Kombinationen von Protein-Interaktionen untersucht.

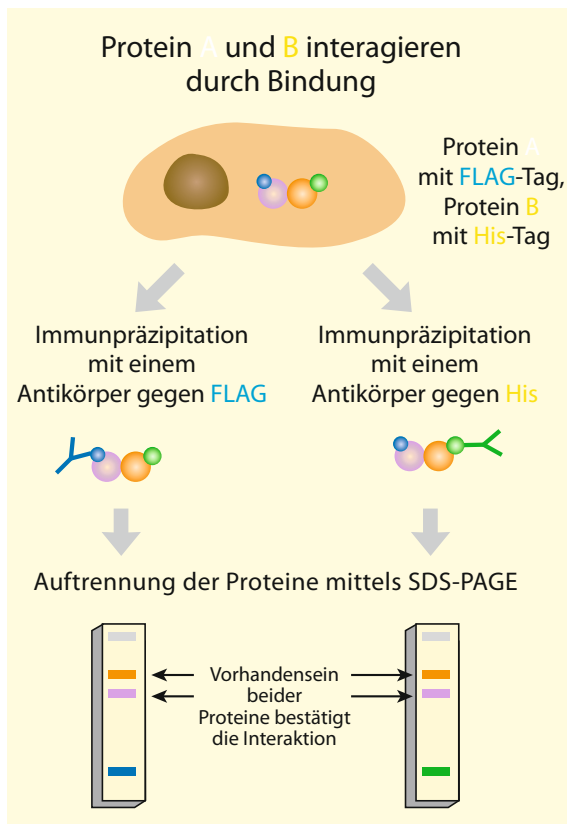
Das *yeast two hybrid*-System unterliegt einigen Einschränkungen. Da sich die Transkriptionsfaktoren im Zellkern befinden müssen, um zu funktionieren, müssen auch die Zielproteine im Nucleus funktionieren. Bei einigen Proteinen kann es zu einer falschen Faltung kommen, wenn sie in den Zellkern gelangen. Bei anderen sind im Zellkern nicht die richtigen Cofaktoren verfügbar, und die Proteine sind instabil. Große Proteine werden mitunter nicht entsprechend exprimiert oder sind toxisch für die Hefe und führen zu falschnegativen Resultaten.

Mit der *yeast two hybrid*-Analyse kann man Proteine finden, die aneinander binden. Zelluläre Proteine binden an die AD von GAL4 oder an die DBD von GAL4. Wenn zwei zelluläre Proteine die AD und DBD zusammenbringen, bindet das vollständige GAL4 an den Promotor des Reportergens. Die Produkte des Reportergens ermöglichen es der Hefe, auf Histidin-freiem Medium zu wachsen oder eine blaue Farbe anzunehmen auf Medien, die X-Gal enthalten.

Protein-Protein-Interaktionen durch Co-Immunpräzipitation

Mit der Technik der **Co-Immunpräzipitation** kann man Protein-Protein-Interaktionen im Cytoplasma statt im Zellkern untersuchen (Abb. 9.24). Hierbei wird das Zielprotein in kultivierten Säugetierzellen exprimiert; diese werden dann einer Lyse unterzogen, um den cytoplasmatischen Inhalt freizusetzen. Das Zielprotein wird mit einem Antikörper aus dem Lysat präzipitiert. Andere mit dem Zielprotein assoziierte Proteine bleiben mit dem Antikörper-Protein-

Komplex assoziiert. (Sofern für das Zielprotein kein Antikörper existiert, kann man an das Protein einen kleinen Tag [wie FLAG oder His6; s. weiter oben] koppeln.) Protein A aus *Staphylococcus* bindet wiederum die Antikörper. Bevor Protein A dem Zelllysats zugefügt wird, bindet man es an Kügelchen. Dadurch entstehen sehr große Zielprotein/Antikörper/Pro-



9.24 Co-Immunpräzipitation

Um festzustellen, ob im Cytoplasma Protein A oder Protein B interagiert, wird jedes Protein zur einfacheren Isolierung mit einem unterschiedlichen Tag markiert. Jedes Fusionsprotein wird in Säugetierzellen exprimiert. Diese werden anschließend einer Lyse unterzogen, um die Zellproteine freizusetzen. Die Lyse muss sehr vorsichtig erfolgen, damit dabei nicht die Interaktionen zwischen den Proteinen zerstört werden. Die Fusionsproteine können anhand der Tag-Sequenz isoliert werden. Jedes Tag-markierte Protein und alle damit assoziierten Proteine werden unabhängig voneinander isoliert. Auf der linken Seite wird z.B. mit FLAG markiertes Protein A mit einem Antikörper gegen die FLAG-Sequenz isoliert, auf der rechten Seite das mit His6 markierte Protein B mit einem Antikörper gegen die His6-Sequenz. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Proteinkomplexe mittels SDS-PAGE. Dieses Beispiel zeigt die Interaktion der beiden markierten Proteine A und B.

tein A/Kügelchen-Komplexe, die man mittels Zentrifugation vorsichtig von den übrigen Zellproteinen abtrennen kann. Durch SDS-PAGE kann man die Komplexe nach Größe auftrennen. Auf dem Gel sollten das Zielprotein, der Antikörper, Protein A und weitere Banden erkennbar sein, die interagierende Proteine repräsentieren. Diese können durch Proteinsequenzierung und/oder Massenspektrometrie identifiziert werden.

Häufig versucht man die Ergebnisse einer *yeast two hybrid*-Analyse durch eine Co-Immunpräzipitation zu bestätigen, vor allem bei Säugetierproteinen. Bei vielen Two-Hybrid-Versuchen ergeben sich neue, noch nicht charakterisierte Proteine. Um die Interaktion zu bestätigen, werden beide Proteine für eine leichtere Isolierung mit einem Tag versehen. Das Markieren mit einem Tag ist sehr viel einfacher, als für jedes neue Protein einen spezifischen Antikörper zu erzeugen. Protein A wird beispielsweise mit FLAG markiert, Protein B hingegen mit His6. (Nicht verwechseln: Dieses Protein A ist *nicht* das Protein A aus *Staphylococcus*.) Jedes Vektorkonstrukt wird in eine Säugetierzelllinie transformiert und jedes Protein exprimiert. Das Zelllysats wird aufgenommen und auf zwei Proben aufgeteilt. Aus der ersten Probe isoliert man die Protein-A-Komplexe, aus der zweiten die Protein-B-Komplexe. Die verschiedenen Proteine der beiden Proben werden mittels SDS-PAGE getrennt. Interagieren die beiden Proteine, so sind alle beide in beiden Proben nachzuweisen.

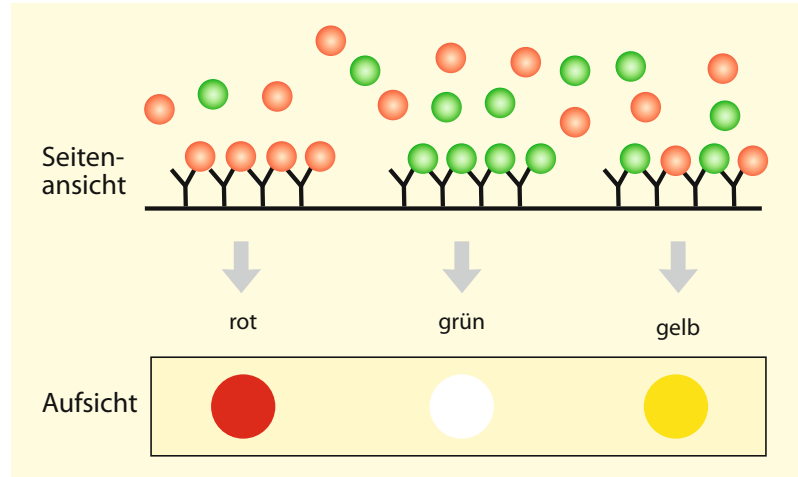
Mittels Co-Immunpräzipitation kann man feststellen, ob zwei Proteine im Cytoplasma aneinander binden.

Protein-Arrays

Arrays zum Nachweis von Proteinen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: in solche, die Antikörper verwenden, und solche, die auf der Verwendung von Tags basieren. Beim **ELISA-Test** (s. Kap. 6) werden Antikörper gegen spezifische Proteine an einen festen Träger gebunden, etwa eine Mikrotiterplatte oder einen Objektträger. Anschließend wird die Proteinprobe zugefügt. Wenn das Zielprotein vorhanden ist, bindet es an seinen komplementären Antikörper. Gebundene Proteine kann man durch Zugabe eines markierten zweiten Antikörpers nachweisen.

9.25 Ideale Ergebnisse eines Antigen Capture Immunoassays

Eine Reihe verschiedener Antikörper wird an unterschiedliche Regionen eines festen Trägers gebunden. An jedem Punkt befindet sich ein anderer Antikörper. Erkennt der Antikörper ausschließlich mit Cy5 markierte Proteine, wird der Bereich rot fluoreszieren (links). Wenn der Antikörper hingegen nur Proteine erkennt, die mit Cy3 markiert sind, fluoresziert der Bereich grün (Mitte). Erkennt der Antikörper Proteine unter beiden Bedingungen, leuchtet der Bereich gelb (rechts).



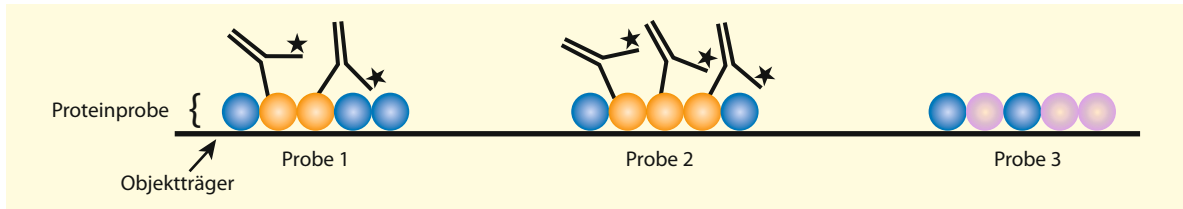
Ein weiterer auf Antikörpern beruhender Array zum Proteinnachweis ist der sogenannte **Antigen Capture Immunoassay** (Abb. 9.25). Ähnlich dem ELISA-Test werden auch bei dieser Methode an eine feste Oberfläche gebundene Antikörper gegen verschiedene Proteine verwendet. Die zu analysierende Proteinprobe wird isoliert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Bei einem Vergleich zweier Bedingungen kann man Proteine aus Probe 1 mit grün fluoreszierendem Cy3 markieren, Proteine aus Probe 2 mit rot fluoreszierendem Cy5. Nach Zugabe der Proben zum Antikörper-Array binden die komplementären Proteine an ihre verwandten Antikörper. Enthalten Probe 1 und Probe 2 identische Proteine, die an den gleichen Antikörper binden, fluoresziert der Fleck gelb. Enthält Probe 1 ein Protein, das in Probe 2 fehlt, erscheint der Fleck grün. Umgekehrt leuchtet der Fleck rot, wenn Probe 2 ein Protein enthält, das in Probe 1 nicht vorhanden ist. Diese Methode eignet sich gut zum Vergleich von Expressionsprofilen von Proteinen unter zwei unterschiedlichen Bedingungen.

Bei der dritten Methode, dem **direkten Immunoassay** sind die Proteine der Probe an einen festen Träger gebunden (Abb. 9.26). Diese Proteine werden dann mit einem spezifisch markierten Antikörper analysiert. Dabei kann man sowohl das Vorhandensein als auch die Menge des Proteins überprüfen. Es ist beispielsweise möglich, Proteine von verschiedenen Patienten mit Prostatakrebs zu isolieren, auf Objektträger zu spotten und jede der Proben auf spezifische Proteinmarker oder auf das Vorhandensein anderer Krebsproteine zu untersuchen. Anhand der Mengen bestimmter Proteine können Wissenschaft-

ler mithilfe dieses Immunoassays eventuell Rückschlüsse auf die Stadien des Prostatakrebses ziehen.

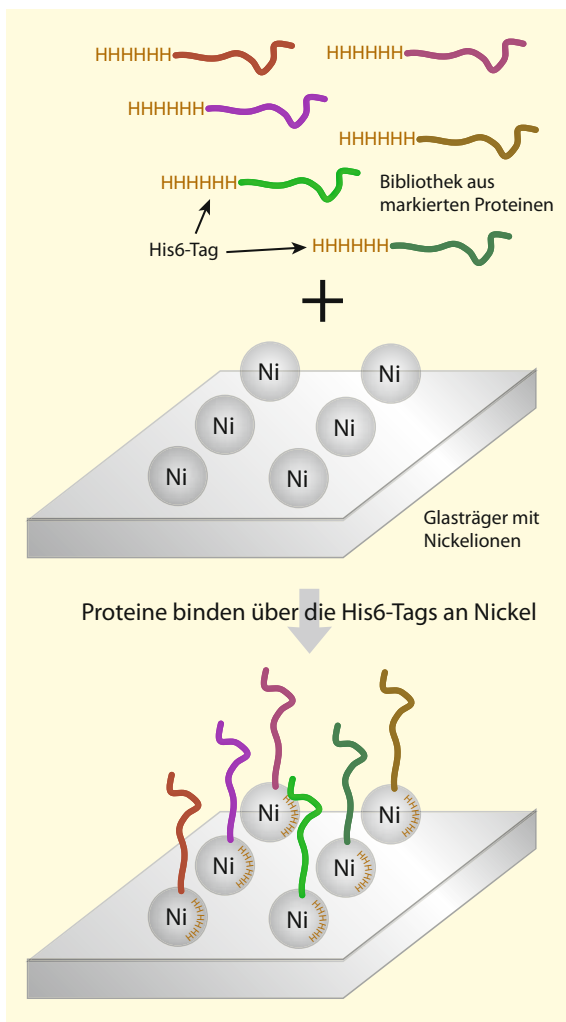
Das größte Problem bei Immunoassays ist der Antikörper. Bei vielen Antikörpern kommt es zu Kreuzreaktionen mit anderen zellulären Proteinen, wodurch man falschpositive Ergebnisse erhält. Außerdem ist die Bindung von Proteinen an einen festen Träger nicht unbedingt repräsentativ für die Bedingungen in einer Zelle. Die Proteine sind nicht gereinigt und aufgetrennt; deshalb enthalten die Proben sehr unterschiedliche Proteine. Einige Proteine binden schneller und besser als andere. Ebenso könnte es sein, dass nur in geringen Mengen vorhandene Proteine nicht um Bindungsstellen konkurrieren. Als weiteres Problem kommt hinzu, dass viele Proteine in Komplexen vorliegen, sodass andere Proteine im Komplex die Antikörperbindungsstelle maskieren können.

Anstelle von Antikörpern binden Protein-Arrays das Protein mithilfe von Fusions-Tags an einen festen Träger (Abb. 9.27). Mit dem Einsatz von Protein-Arrays zur Feststellung der Funktion von Proteinen und Protein-Interaktionen wurden *yeast two hybrid*-Assays und die Co-Immunpräzipitation auf natürliche Weise erweitert. Mit Protein-Arrays kann man Tausende von Proteinen zugleich untersuchen, sie bieten also eine sehr effektive Technik zur Erforschung des Proteoms. Häufig werden Protein-Arrays bei Hefe angewandt, da ihr Proteom nur rund 6000 Proteine umfasst. Es wurden Bibliotheken erstellt, in denen jedes Protein mit einem His6- oder GST-Tag markiert ist. Diese Proteine werden dann über die Tags an einen festen Träger gebunden, beispielsweise einen mit Nickel oder Glutathion beschichteten Objektträger. Für die Konstruktion des Arrays wird je-



9.26 Direkter Immunoassay

Bei direkten Immunoassays werden die Proteinproben an verschiedene Stellen eines festen Trägers gebunden. An jeder Stelle befindet sich eine andere Proteinprobe. Anschließend wird ein mit einem Detektionssystem markierter Antikörper zugefügt. Der Antikörper bindet ausschließlich an sein Zielprotein. In diesem Beispiel erkennt der Antikörper nur ein Protein in den Patientenproben Nr. 1 und 2.



9.27 Prinzip eines Protein-Arrays

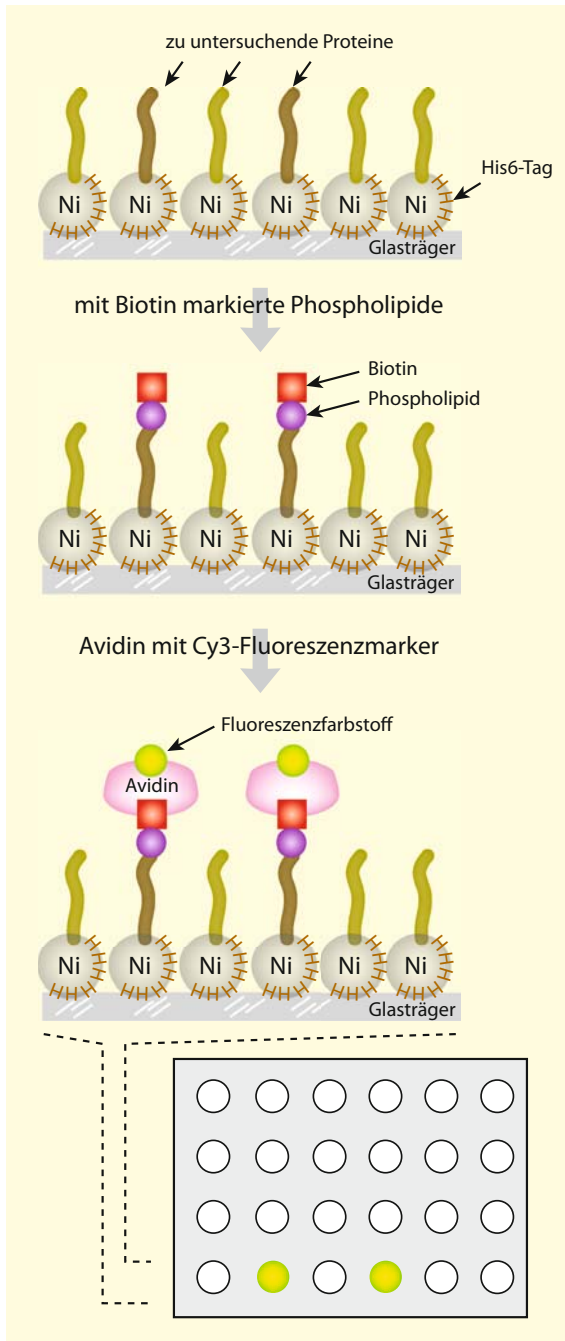
Zur Herstellung eines Protein-Microarrays wird eine Bibliothek aus mit His6-Tags markierten Proteinen mit einem nickelbeschichteten Glasträger inkubiert. Überall, wo Nickelionen vorhanden sind, binden Proteine an den Träger.

des Protein einzeln isoliert und auf den Objektträger aufgebracht. Nach Bindung der markierten Proteine an den Träger werden die übrigen Zellbestandteile durch Waschen entfernt. Somit befindet sich an jedem Testfeld (Spot) nur ein einziges mit Tag markiertes Protein.

Nach Fertigstellung des Arrays kann man die Proteine auf eine bestimmte Funktion untersuchen. Michael Snyder untersuchte das Hefeproteom in seinem Labor an der Yale University auf Proteine, die **Calmodulin** (ein kleines, Ca^{2+} -bindendes Protein) oder Phospholipide binden (Abb. 9.28). Dazu markierte er beide jeweils mit Biotin und inkubierte sie zusammen mit einem Glasträger, auf dem über His6-Nickel-Wechselwirkungen sämtliche Hefeproteine gebunden waren. Durch Inkubation des Glasträgers mit Cy3-markiertem Streptavidin wurde das Biotin-markierte Calmodulin oder Phospholipid sichtbar gemacht (Streptavidin geht eine sehr feste Bindung mit Biotin ein.) Auf diese Weise konnten 39 verschiedene Calmodulin-bindende Proteine identifiziert werden (zuvor waren lediglich sechs bekannt) sowie 150 verschiedene Phospholipid-bindende Proteine.

Bei Antigen-Capture-Immunoassays werden verschiedene Antikörper an einen festen Träger gebunden. Dieser Array wird dann zusammen mit einer Probe von fluoreszenzmarkierten Proteinen inkubiert. Bindet ein Antikörper an sein zelluläres Protein, so zeigt sich an diesem Spot eine Fluoreszenz.

Bei Umkehrphase-Arrays sind die Proteinproben an den festen Träger gebunden, wobei sich an jedem Spot viele verschiedene zelluläre Proteine befinden. Der Träger wird dann zusammen mit markiertem Antikörper inkubiert. Durch das Detektionssystem des Antikörpers kann man feststellen, welche Proteinprobe mit dem Antikörper interagiert hat.



9.28 Screening von Protein-Arrays mit Biotin/Streptavidin

Protein-Microarrays können z.B. daraufhin untersucht werden, ob die Proteine Phospholipide binden. Dazu inkubiert man den Protein-Microarray mit Phospholipiden, die an Biotin gebunden sind. Gebundenes Phospholipid kann man dann mithilfe von Streptavidin sichtbar machen, an das ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Fluoreszierende Spots repräsentieren jeweils Proteine, die Phospholipide binden.

Metabolomik

Mit zunehmender Genauigkeit und Empfindlichkeit der Methoden zur Identifizierung kleiner Moleküle wurde auch die Erforschung des Stoffwechsels umfassender. Das **Metabolom** umfasst sämtliche kleinen Moleküle und Stoffwechselzwischenstufen eines Systems wie einer Zelle oder eines gesamten Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt. Das Metabolom zu verstehen gestaltet sich recht schwierig, weil sich die kleinen Metaboliten auf viele andere Bestandteile einer Zelle auswirken. Metaboliten durchlaufen ein kompliziertes Netzwerk und bilden zahlreiche verschiedene kurzlebige Komplexe. Man könnte das Netzwerk der Metaboliten mit dem Straßennetz einer Großstadt vergleichen. An jeder Straßenecke muss eine Entscheidung getroffen werden, welcher Weg eingeschlagen wird, und das immer wieder, bis man schließlich sein Ziel erreicht hat. Jedes Metabolitmolekül folgt einem bestimmten Stoffwechselweg, der oft mehrere mögliche Verzweigungen aufweist. An jeder Kreuzung fällt vor dem nächsten Schritt eine solche Entscheidung. Die Charakterisierung des Metaboloms unter bestimmten Bedingungen bezeichnet man als **Metabolom-Fingerprinting** (engl. *metabolic fingerprinting*).

Durch mehrere Techniken zur Auftrennung und/oder Identifizierung kleiner Metaboliten wurde die Metabolomik erst möglich. Die Kernresonanzspektroskopie oder NMR-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*) der Extrakte von Zellen, die mit ^{13}C -Glucose kultiviert wurden, ermöglichte eine gleichzeitige Messung mehrerer Stoffwechselzwischenstufen.

Auch mittels Dünnschichtchromatographie nach Kultur mit ^{14}C -Glucose konnte man Metaboliten identifizieren. Diese Methoden sind nicht sehr empfindlich, sodass dadurch einige Metaboliten nicht getrennt oder identifiziert werden können.

Die beste Methode für die Analyse gesamter Metabolome bietet die Massenspektrometrie. Mit dieser Technik lassen sich viele verschiedene Metaboliten identifizieren (sogar bislang unbekannte), und sie ist ausgesprochen sensitiv. Mittels Massenspektrometrie kann man die exakte Molekülformel einer Verbindung bestimmen und so jeden Metaboliten identifizieren. Selbst bei Isomeren ergibt sich trotz gleicher Molekülformel ein unterschiedliches Fragmentierungsmuster.

Zur Vereinfachung der Analyse wird die Massenspektrometrie häufig mit anderen Methoden gekoppelt. So kann man die Metaboliten vor der massenspektrometrischen Analyse mithilfe verschiedener

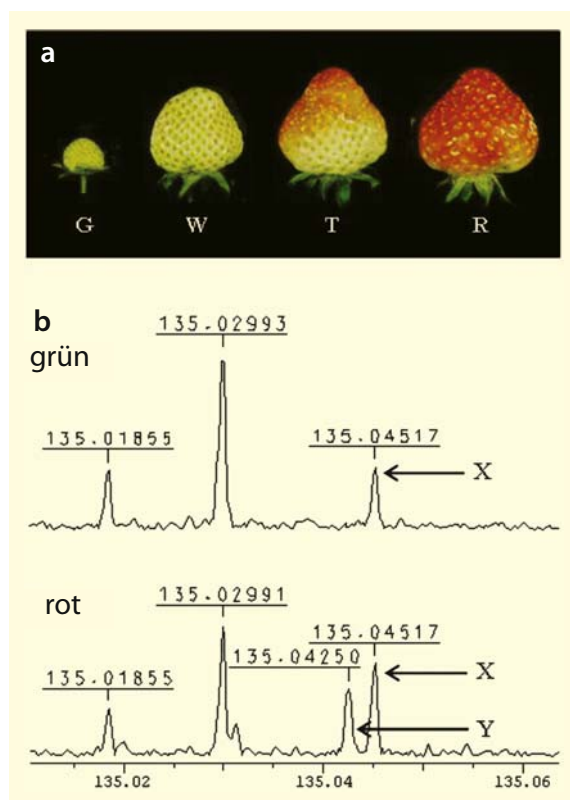
Chromatographieformen auftrennen. Beispielsweise ist es möglich, den komplexen Zellextrakt durch HPLC in verschiedene Fraktionen zu trennen, die massenspektrometrisch analysiert werden können.

Besonders wertvoll ist die Metabolomik für die Erforschung von Pflanzen, weil sich die Metaboliten auf deren Farbstoffe, Duft, Geschmack und Nährstoffgehalt auswirken – alles wirtschaftlich bedeutende Merkmale. Die Analyse dieser Metaboliten mittels Massenspektrometrie wird dazu beitragen,

schmackhaftere und frischere Produkte zu entwickeln. In Erdbeeren lassen sich beispielsweise durch Massenspektrometrie 7000 Metabolite nachweisen (Abb. 9.29). Bei einem Vergleich von weißen und roten Erdbeeren konnte man feststellen, welche der Metabolitenpeaks im Massenspektrum den Zwischenstufen der Farbstoffsynthese entsprechen.

Das Metabolom besteht aus der Gesamtheit kleiner Moleküle und Metaboliten eines Systems wie einer Zelle oder eines Organismus.

Weil das Metabolom dynamisch ist, entspricht ein Metabolom-Fingerprint der Gesamtheit aller kleinen Metaboliten zu einem bestimmten Zeitpunkt.



9.29 Metabolomanalyse von Erdbeeren

Nicht zielgerichtete Metabolomanalyse bei Erdbeeren. **a** Vier aufeinanderfolgende Stadien der Fruchtentwicklung von Erdbeeren (G = grün, W = weiß, T = teilweise gefärbt, R = rot) wurden mittels Fouriertransformation-Massenspektrometrie (FTMS) metabolisch analysiert. An ähnlichen Fruchtproben wurden zuvor schon Genexpressionsanalysen mit cDNA-Microarrays durchgeführt. **b** Ein Beispiel für eine hoch auflösende ($> 100\,000$) Auftrennung von sehr nahe beieinander liegenden Massenpeaks aus Analysedaten von grünen und roten Stadien der Fruchtentwicklung. Mit einem X markierte Peaks haben die gleiche Masse, während Peak Y davon um nur 3 ppm abweicht. Mit freundlicher Genehmigung von Phenomenome Discoveries Inc., Saskatoon, Kanada.

► Weiterführende Literatur

- Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Hughes TR, Robinson MD, Mitsakakis N, Johnston M (2004) The promise of functional genomics: Completing the encyclopedia of a cell. *Curr Opin Microbiol* 7: 546–554
- López-Otin C, Overall CM (2002) Protease degradomics: A new challenge for proteomics. *Mol Cell Biol* 3: 509–519
- MacBeath G (2002) Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* 32: 526–532
- Medzihradsky KF (2005) Peptide sequence analysis. *Methods Enzymol* 402: 209–
- Renneberg R (2008) *Bioanalytik für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Steen H, Mann M (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 699–711
- Zhang H, Yan W, Aebersold R (2004) Chemical probes and tandem mass spectrometry: A strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes. *Curr Opin Systems Biol* 8: 66–75

Rekombinante Proteine

Proteine und rekombinante DNA-Technologie
Expression eukaryotischer Proteine in Bakterien
Translationsexpressionsvektoren
Auswirkungen des Codongebrauchs
Vermeidung toxischer Wirkungen durch Proteinüberproduktion
Erhöhung der Proteinstabilität
Verbesserung der Proteinsekretion
Fusionsprotein-Expressionsvektoren
Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen
Expression von Proteinen in Hefezellen
Expression von Proteinen in Insektenzellen
Proteinglykosylierung
Expression von Proteinen in Säugetierzellen
Expression mehrerer Untereinheiten in Säugetierzellen
Vergleich von Expressionssystemen
Weiterführende Literatur

Proteine und rekombinante DNA-Technologie

Die Proteomik hat die Tür geöffnet, um immer mehr klinisch bedeutende Proteine zu identifizieren. Sind die Proteine erst einmal identifiziert, so muss man sie im Detail erforschen. Dazu gehört beispielsweise auch die Expression des Proteins in Modellorganismen mithilfe rekombinanter DNA-Technologien (s. Kap. 3). Sofern einige der Proteine zu therapeutischen Zwecken genutzt werden, benötigt man große Mengen gereinigtes Protein.

Nach dem Klonieren eines Gens ist es relativ einfach, das von ihm codierte Protein in großen Mengen zu produzieren. Einige Beispiele für solche **rekombinanten Proteine** sind in Tabelle 10.1 aufgelistet. Für die Synthese kleinerer Nichtproteinmoleküle – die für einen organischen Chemiker einfacher erscheinen – werden ein halbes Dutzend Proteine (Enzyme) benötigt, die seriell zusammenarbeiten. Paradoxe Weise wurden Proteine, obwohl es sich dabei um Makromoleküle handelt, häufiger gentechnisch verändert als einfachere Produkte wie Antibiotika. Die Technik des sogenannten Stoffwechsel-Engineering (engl. *pathway engineering*) zur Synthese kleiner organischer Moleküle wird im folgenden Kapitel (Kap. 11) beschrieben.

Soll ein Gen für eine groß angelegte Produktion exprimiert werden, ergeben sich gegenüber Laborbedingungen zusätzliche Probleme. Je mehr Kopien eines Gens eine Zelle enthält, desto größer ist die Menge des Genprodukts. Daher erhält man durch Klonieren eines Gens in ein *high-copy*-Plasmid in der Regel einen höheren Ertrag des Genprodukts. *High-copy*-Plasmide sind allerdings häufig instabil, insbesondere in Kulturen mit hoher Dichte, wie sie in der Industrie verwendet werden. Zwar lassen sich die meisten Plasmide durch das Vorhandensein eines Antibiotikaresistenzgens in Kultur halten, aber Antibiotika sind kostspielig, speziell in industriellem Maßstab. Verhindern lässt sich der Verlust von Plasmiden beispielsweise durch den Einbau eines Fremdgens in das Chromosom der Wirtszelle. Dadurch verringert sich jedoch die Kopienzahl des klonierten Gens auf eine. Daher hat man versucht, mehrere Kopien klonierter Gene in Tandem-Arrays einzubauen. Das Vorhandensein multipler Kopien hat allerdings eine Instabilität zur Folge, weil es zwischen homologen DNA-Sequenzen zur Rekombination kommt.

Rekombinante Proteine sind klinisch bedeutende Proteine, die in großen Mengen produziert werden. Das Gen für das betreffende Protein wird in einen Vektor kloniert und in einem Modellorganismus zu einem Protein exprimiert.

Tabelle 10.1 Durch rekombinante Technologien synthetisierte Proteine

Protein	Funktion
Erythropoetin	regt bei der Behandlung von Anämien die Bildung der roten Blutkörperchen an
Faktor VIII	fördert bei Blutern die Blutgerinnung
Filgrastim und Sargramostim (Blutzellen-stimulierende Knochenmarksfaktoren)	lassen die Zahl der weißen Blutkörperchen nach Strahlungs-therapie oder Transplantationen nach oben schnellen
Insulin	Behandlung von Diabetes
Interferon (α)	Behandlung von Hepatitis B und C, von Genitalwarzen, bestimmten Leukämien und anderen Krebsarten
Interferon (β)	Behandlung von multipler Sklerose
Interferon (γ)	Behandlung von septischer Granulomatose
Interleukin-2	tötet Tumorzellen ab
Somatotropin	Behandlung von Wachstumshormonmangel
gewebespezifischer Plasminogenaktivator (t-PA)	Auflösung von Blutgerinnseln zur Vorbeugung und Linderung von Herzinfarkten

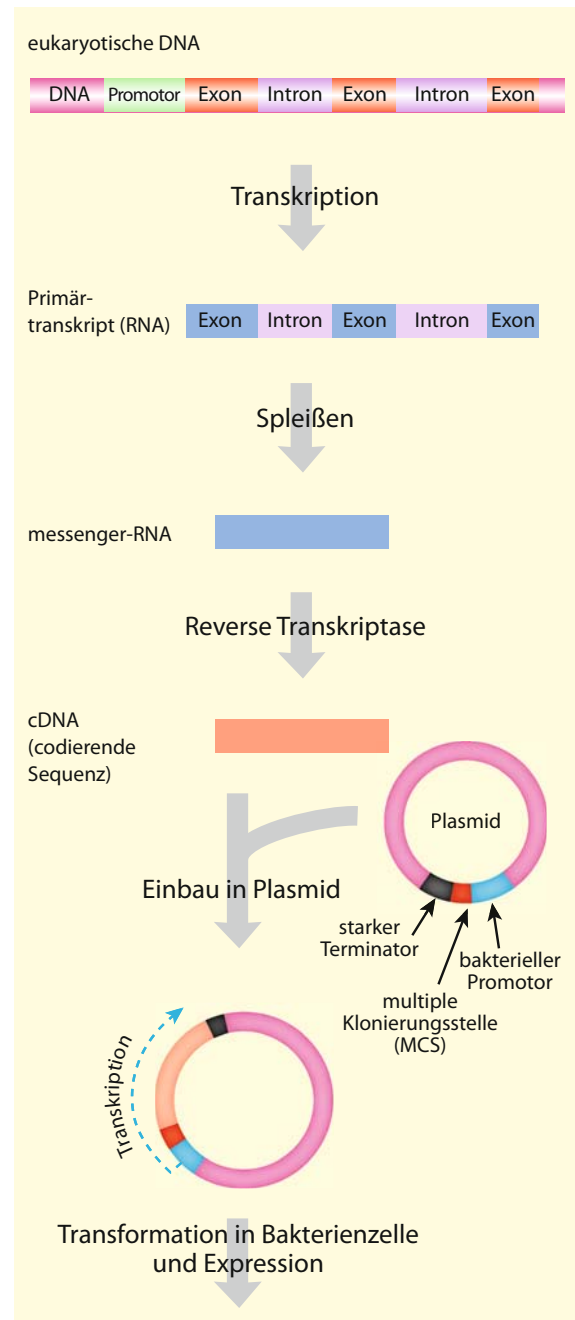
Expression eukaryotischer Proteine in Bakterien

Kapitel 3 hat sich bereits mit den Grundlagen befasst, wie man Gene in verschiedene Vektoren kloniert. Ob klonierte Gene erfolgreich exprimiert werden, hängt von mehreren Faktoren ab. Bakteriengene werden in der Regel exprimiert, indem sie mithilfe von Klonierungsvektoren in bakterielle Wirtszellen überführt werden – vorausgesetzt, sie befinden sich in der Nähe eines geeigneten bakteriellen Promotors. Oft verwendet man spezielle Plasmide, sogenannte **Expressionsvektoren**, um die Genexpression zu steigern. Wie in Kapitel 3 angemerkt, liefern diese einen starken Promotor für die Expression des klonierten Gens. Expressionsvektoren enthalten auch Gene für Antibiotikaresistenz und ermöglichen die Selektion des Vektors und daher auch des rekombinanten Proteins. Zusätzlich müssen sie einen für den Wirt geeigneten Replikationsursprung aufweisen.

Die Expression eukaryotischer Proteine ist problematischer. Zwar kann man dazu auch eukaryotische Zellen verwenden, aber Bakterien sind einfacher zu kultivieren und genetisch zu manipulieren. Daher ist es häufig wünschenswert, eukaryotische Proteine in Bakterien zu exprimieren (Abb. 10.1). Allerdings funktionieren eukaryotische Promotoren in Bakterienzellen nicht, weshalb ein bakterieller Promotor zur Verfügung gestellt werden muss. Außerdem können Bakterien keine Introns verarbeiten. Deshalb wird standardmäßig die cDNA-Version eukaryotischer Gene kloniert, die keine Introns aufweist und ausschließlich aus ununterbrochenen codierenden Sequenzen besteht. Tatsächlich verwendet man generell die cDNA-Version eukaryotischer Gene, selbst zur Expression in Eukaryotenzellen. Damit lassen sich nicht nur mögliche Probleme bei der Prozessierung vermeiden; auch die DNA-Menge ist weitaus geringer und folglich leichter handhabbar.

Selbst wenn ein kloniertes Gen in hohem Umfang transkribiert wird, kann die Produktion des codierten Proteins auf der Stufe der Proteinsynthese eingeschränkt sein. Verschiedene mRNA-Moleküle werden unterschiedlich effizient translatiert. Das liegt an mehreren Faktoren:

1. Stärke der Wechselwirkung von Ribosomenbindungsstelle und Ribosomen;
2. Stabilität und/oder Sekundärstruktur der mRNA;
3. Codongebrauch.



10.1 Expression eukaryotischer Gene in Bakterien im Überblick

Eukaryotische Gene müssen zur Expression in Bakterien entsprechend angepasst werden. Zunächst wird die mRNA aus dem betreffenden Gen in cDNA umgewandelt, damit man eine ununterbrochene codierende DNA erhält. Anschließend wird die cDNA zwischen einen bakteriellen Promotor und einen bakteriellen Terminator kloniert. Dadurch kann die Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Bakterien die codierende Sequenz exprimieren.

Neben den Standardexpressionsvektoren existieren noch fortschrittlichere Vektoren, mit denen sich diese und weitere Aspekte der Produktion von Proteinen optimieren lassen. In diesem Kapitel geht es darum, wie sich durch Verwendung von Translationsvektoren und Fusionsvektoren die Synthese eines rekombinanten Proteins aus einem klonierten Gen steigern lässt.

Für die Synthese eukaryotischer Proteine in Bakterien werden Expressionsvektoren verwendet. Der Vektor enthält die Ribosomenbindungsstelle, die Terminationssequenzen und einen stark regulierten Promotor. Bei dem eukaryotischen Gen handelt es sich um eine cDNA-Kopie der mRNA.

Translationsexpressionsvektoren

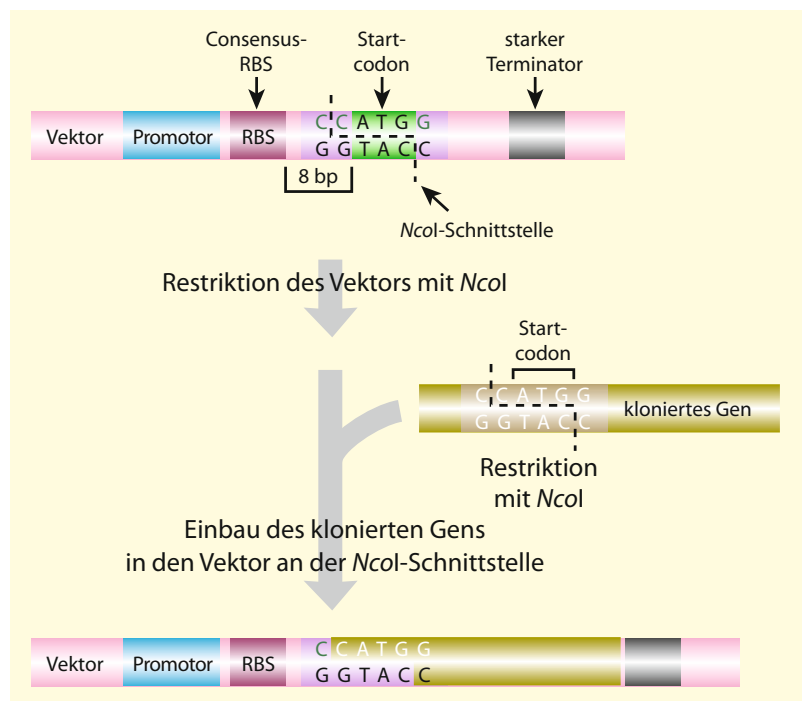
Wie in Kapitel 2 ausgeführt, binden bakterielle Ribosomen mRNA, indem sie die Ribosomenbindungsstelle (RBS, auch als Shine-Dalgarno-Sequenz bezeichnet) erkennen. Die RBS geht eine Basenpaarung mit der Sequenz AUUCCUCC auf der 16S-rRNA der

kleinen Untereinheit der Ribosomen ein. Je ähnlicher die RBS der Consensussequenz (also UAAGGAGG) ist, desto stärker ist diese Verbindung. Dies führt im Allgemeinen zu einer effizienteren Initiation der Translation. Für eine optimale Translation muss die RBS zudem im richtigen Abstand vom Startcodon AUG liegen.

Expressionsvektoren sind darauf ausgerichtet, die Genexpression auf der Ebene der Transkription (s. Kap. 3) zu optimieren. Man kann jedoch auch **Translationsexpressionsvektoren** erzeugen und so eine optimale Initiation der Translation gewährleisten. Diese Vektoren besitzen eine Consensus-RBS plus ein ATG-Startcodon in optimalem Abstand (8 bp) strangabwärts der RBS. Das klonierte Gen wird an einer Klonierungsstelle eingebaut, die mit dem Startcodon überlappt. Sehr gut geeignet ist das Restriktionsenzym *Nco*I, da seine Erkennungssequenz (C/CATGG) ATG enthält. Daher ist es möglich, ein kloniertes Gen so einzubauen, dass sein ATG genau mit dem ATG des Translationsexpressionsvektors zusammentrifft (Abb. 10.2). Das zu exprimierende Gen wird mit *Nco*I an seinem 5'-Ende und mit einem anderen geeigneten Restriktionsenzym an seinem 3'-Ende herausgeschnitten. Falls nötig, kann man mittels ortsspezifischer Mutagenese oder PCR künstlich eine *Nco*I-Schnittstelle in das Gen einbauen.

10.2 Translationsexpressionsvektor

Die Erkennungsstelle für *Nco*I ist C/CATGG; diese enthält auch die Abfolge ATG. Sowohl das interessierende Gen als auch der Translationsvektor haben jeweils eine *Nco*I-Schnittstelle, sodass das betreffende Gen genau an die richtige Stelle für eine maximale Proteinexpression eingebaut werden kann. Zudem enthält der Vektor eine Consensus-RBS, acht Basenpaare von ATG entfernt; diese bildet eine optimale Bindungsstelle für Ribosomen. Die Terminatorsequenz(en) ist/sind ebenfalls stark und verhindern ein Fortfahren der Transkription.



Translationsexpressionsvektoren zeichnen sich auch durch einen günstigen selektiven Marker aus, gewöhnlich eine Resistenz gegen Ampicillin oder ein anderes Antibiotikum. Außerdem besitzen sie einen starken, regulierten Transkriptionspromotor. Strangabwärts der Klonierungsstelle befinden sich zwei oder drei starke Terminationssequenzen, die verhindern, dass die Transkription sich innerhalb der Plasmidgene fortsetzt.

Zwar können Translationsexpressionsvektoren die Initiation der Translation optimieren, sie wirken sich aber nicht auf die anderen schon angeführten Faktoren aus, die Eigenschaften der Sequenz jedes einzelnen Gens sind. Beispielsweise kann sich die Sekundärstruktur der mRNA signifikant auf den Umfang der Translation auswirken. Ist durch eine Auffaltung der mRNA die RBS und/oder das Startcodon blockiert, so wird die Translation behindert. Vor allem die Sequenz der ersten Codons der codierenden Sequenz sollte auf mögliche Basenpaarungen mit der Region um die RBS überprüft werden. Wenn nötig, können Basen an der dritten (redundanten) Position jedes Codons ausgetauscht werden, um solche Basenpaarungen zu verhindern. Eine aktive und umfangreiche Translation zu erreichen ist eine wesentliche Voraussetzung, um eine Instabilität der mRNA zu vermeiden. Jede mRNA, die nicht aktiv translatiert wird, wird letztendlich abgebaut, wodurch sich der Proteinertrag verringert.

Translationsexpressionsvektoren liefern optimale Ribosomenbindungsstellen. Sie weisen zudem stark regulierte Promotoren und mehrere Terminatorsequenzen für eine kontrollierte Transkription auf.

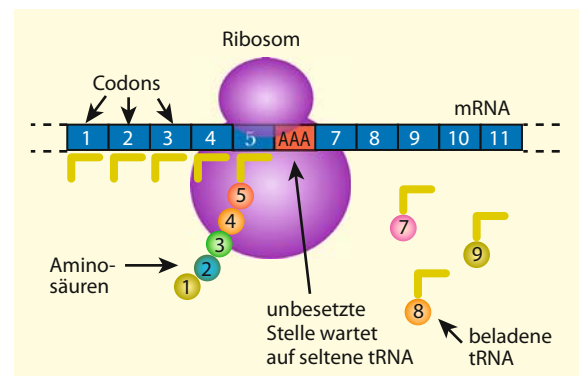
Auswirkungen des Codongebrauchs

Werden Gene eines Organismus in fremden Wirtszellen exprimiert, stellt sich das Problem des **Codongebrauchs** (man spricht auch von Codonbevorzugung, engl. *codon usage* bzw. *codon bias*). Wie in Kapitel 2 erläutert, ist der genetische Code insofern redundant, als mehrere Codons die gleiche Aminosäure codieren können. Auch wenn ein Protein sich durch eine festgelegte Aminosäuresequenz auszeichnet, besteht noch eine beträchtliche Auswahl an entsprechenden Codons, die verwendet werden können. Verschiedene Organismen bevorzugen für dieselbe

Aminosäure unterschiedliche Codons. Beispielsweise wird die Aminosäure Lysin durch die Codons AAA oder AAG codiert. Bei *E. coli* findet zu 75 % AAA Verwendung und nur zu 25 % AAG. Bei *Rhodobacter* ist das Verhältnis genau umgekehrt: Hier dient zu 75 % AAG als Codon – und das, obwohl es sich bei beiden um gramnegative Bakterien handelt.

Abgelesen werden die Codons von der transfer-RNA (tRNA, s. Kap. 2). Verwendet eine Zelle ein bestimmtes Codon nur selten, dann ist jene tRNA, die dieses seltene Codon abliest, in geringeren Mengen vorhanden. Baut man nun ein Gen mit zahlreichen AAA-Codons in eine Zelle ein, die nur selten AAA für Lysin verwendet, herrscht unter Umständen ein solcher Mangel an der entsprechenden tRNA, dass die Proteinsynthese deutlich verlangsamt wird (Abb. 10.3).

Für eine optimale Proteinproduktion muss also der Codongebrauch berücksichtigt werden. Es ist zwar eine Menge Arbeit, aber man kann die DNA-Sequenz von Genen dahingehend ändern, dass man viele Basen an der dritten Position redundanter Codons austauscht. Hierzu wird die DNA-Sequenz des gesamten Gens künstlich synthetisiert. Wie in Kapitel 4 ausgeführt, synthetisiert man einzelne überlappende DNA-Abschnitte und fügt diese dann zu einem kompletten Gen aneinander. Durch eine Optimierung der Codons von Genen für den neuen Wirtszellorganismus lässt sich die Proteinproduktion aufgrund der schnelleren Elongation der Polypeptidkette durch



10.3 Der Codongebrauch wirkt sich auf die Translationsgeschwindigkeit aus

Bakterien bevorzugen für eine bestimmte Aminosäure ein Codon gegenüber anderen redundanten Codons. In diesem Beispiel ist das Ribosom ins Stocken geraten, weil es auf eine Lysin-tRNA mit dem Anticodon UUU wartet. *Escherichia coli* verwendet dieses Codon nicht sehr häufig und verfügt daher nur über eine begrenzte Menge der entsprechenden tRNA.

das Ribosom mitunter auf das Zehnfache steigern. Diese Methode wurde mit Erfolg bei mehreren Insektengiften angewandt, die ursprünglich von *Bacillus thuringiensis* stammen und in transgene Pflanzen kloniert wurden (Näheres hierzu s. Kap. 14).

Ein weiterer, weniger laborintensiver Lösungsansatz für das Problem des Codongebrauchs ist, die seltenen tRNAs zur Verfügung zu stellen. Die seltensten Codons werden nur deshalb nicht verwendet, weil es an entsprechenden tRNAs mangelt. Bei *E. coli* sind die seltensten Codons beispielsweise AGG und AGA; sie codieren beide für Arginin und finden nur mit einer Häufigkeit von 0,14 % beziehungsweise 0,21 % Verwendung. Die tRNA, die diese beiden Codons abliest, wird von dem Gen *argU* codiert. Stellt man dieses Gen über ein Plasmid zur Verfügung, herrscht bei dem Wirt *E. coli* kein Mangel mehr an der entsprechenden tRNA, und das rekombinante Protein kann synthetisiert werden. Inzwischen sind Plasmide erhältlich, die sämtliche Gene für die tRNAs seltener Codons tragen. Diese Plasmide enthalten einen p15A-Replikationsursprung und sind damit kompatibel mit den meisten Expressionsvektoren, die gewöhnlich einen ColE1-Replikationsursprung aufweisen (zur Inkompatibilität von Plasmiden s. Kap. 3).

Jeder Organismus bevorzugt bestimmte Codons für eine Aminosäure. Wenn die DNA-Sequenz für das rekombinante Protein eine selten verwendete tRNA codiert, verlangsamt sich die Proteinproduktion. Lösen lässt sich dieses Problem durch Hinzufügen der seltenen tRNA oder durch Austausch der Base an der Wobble-Position der seltenen Codons.

Vermeidung toxischer Wirkungen durch Proteinüberproduktion

Normalerweise sind höhere Erträge erwünscht, die Überproduktion eines rekombinanten Proteins kann die Wirtszelle jedoch auch schädigen. Wird in Bakterien zu schnell zu viel Protein hergestellt, so bildet der Überschuss **Einschlusskörper**. Das sind dichte Kristalle aus falsch gefalteten, funktionslosen Proteinen (s. unten). Daher verfügen die Expressionssysteme für rekombinante Proteine über Kontrollmöglichkeiten, wann und wie viel Protein die Wirtszelle

synthetisiert. Zwei verbreitete Expressionssysteme bei *E. coli* sind pET und pBAD. Diese haben Kontrollmechanismen zum An- und Abschalten der Synthese rekombinanter Proteine. Das pBAD-System kann auch die Menge des produzierten Proteins regulieren.

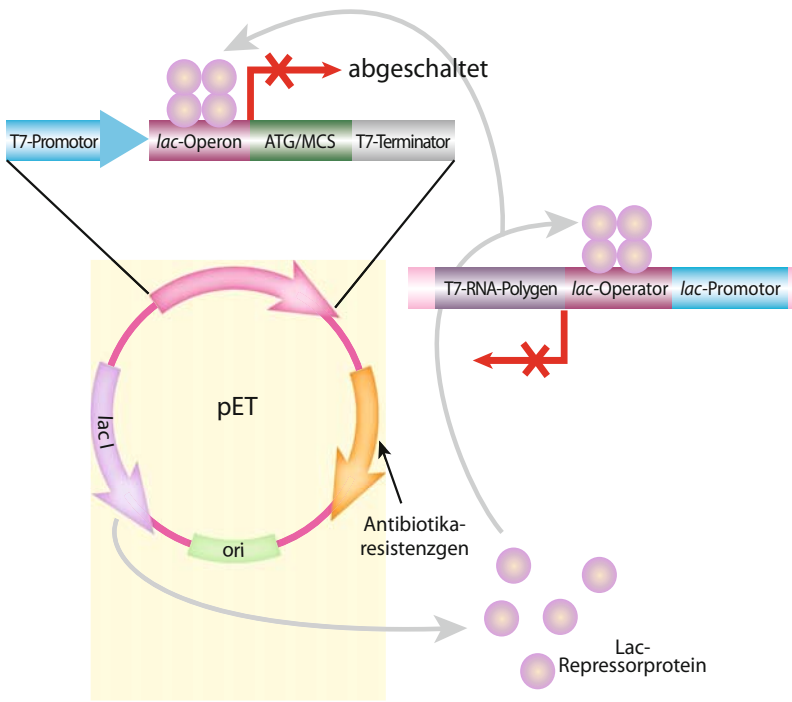
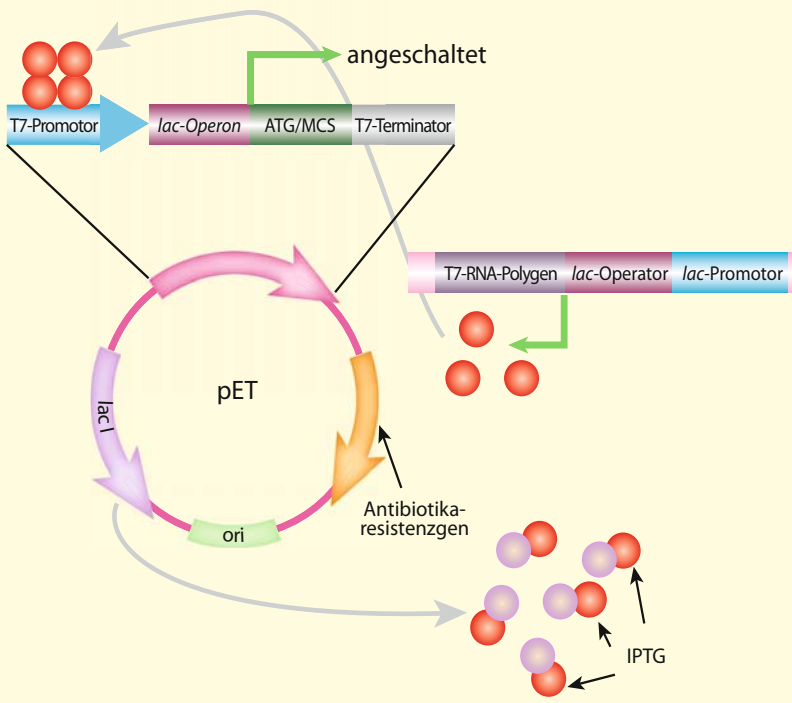
Die pET-Vektoren besitzen einen T7/*lac*-Hybridpromotor, eine multiple Klonierungsstelle und einen T7-Terminator. Für die Transkription dieses hybriden Promotors wird eine T7-RNA-Polymerase benötigt. Bei dem Wirt *E. coli* wurde das Gen für T7-RNA-Polymerase gentechnisch in das Chromosom eingebaut, es wird jedoch von dem *lac*-Operon-Repressor LacI reprimiert. Fügt man IPTG hinzu, so bewirkt dieses die Freisetzung des LacI-Proteins und die Expression des Gens. So wird nun T7-RNA-Polymerase synthetisiert, diese bindet an den T7/*lac*-Hybridpromotor, und das betreffende Klonprotein wird hergestellt (Abb. 10.4).

Das pBAD-System beruht auf dem Arabinose-Operon. Dieses wird durch die Zugabe von Arabinose induziert, die an das AraC-Regulatorprotein bindet. Aktivierte AraC löst sich von der O₂-Stelle ab und bindet an die I-Stelle (Abb. 10.5). Dadurch wird die Expression des klonierten Gens aktiviert. Reguliert wird das pBAD-System durch die Arabinosemenge, die der Kultur zugeführt wird. Wenn das rekombinante Protein für die Wirtszelle toxisch wirkt, setzt man weniger Arabinose zu, was jedoch dazu führt, dass auch weniger rekombinantes Protein produziert wird. Dies ist auf die Kultur zurückzuführen, nicht auf die Zelle. Die Herstellung des rekombinanten Proteins erfolgt in allen Zellen nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip. Durch geringe Mengen Arabinose wird nicht jede Zelle der Kultur aktiviert, bei größeren Mengen hingegen schon.

Die pET- und pBAD-Expressionsvektoren werden zur Regulation der Proteinproduktion verwendet. Sie kontrollieren über Induktoren und Repressoren die Genexpression.

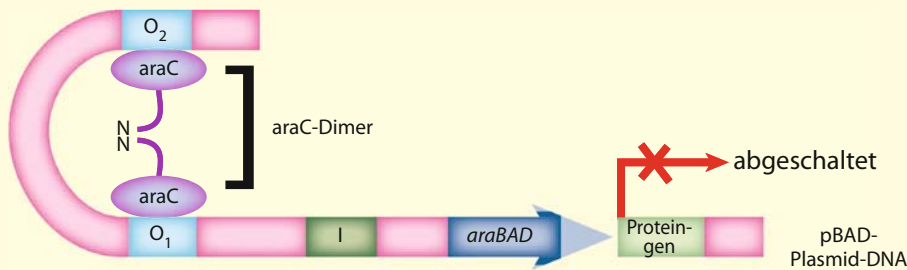
Erhöhung der Proteinstabilität

Verschiedene Proteine unterscheiden sich sehr in ihrer Stabilität. Die Lebensdauer eines Proteins in einer Zelle hängt davon ab, wie schnell es von proteolytischen Enzymen oder Proteasen abgebaut wird (s. Kap. 9). Neben der dreidimensionalen Struktur

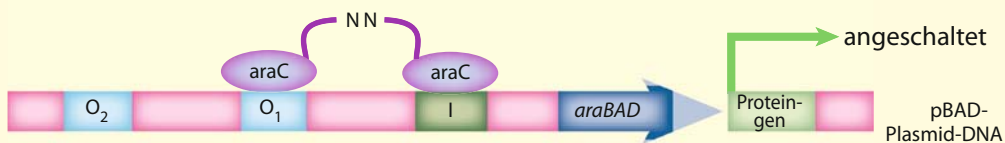
a keine Expression des rekombinanten Proteins**b** Expression des rekombinanten Proteins**10.4 Das pET-Proteinexpressionssystem**

a Rekombinante Proteine werden in der Wirtszelle erst nach Induktion exprimiert. Das pET-Plasmid enthält das Gen für das LacI-Protein, welches sowohl das Gen für T7-RNA-Polymerase auf dem Bakterienchromosom als auch das Gen für das rekombinante Protein auf dem pET-Plasmid reprimiert. **b** Fügt man den Induktor IPTG hinzu, so bewirkt dieser eine Ablösung von LacI von beiden Promotoren. Anschließend wird das Gen für T7-RNA-Polymerase exprimiert. Diese Polymerase transkribiert dann das Gen für das rekombinante Protein.

a Proteinexpression abgeschaltet



b Proteinexpression angeschaltet



10.5 Das pBAD-Expressionssystem

a Bei Bindung des dimeren AraC-Proteins an die Regulationssequenzen O_1 und O_2 auf dem pBAD-Plasmid werden die rekombinanten Proteine nicht exprimiert. **b** Die Anwesenheit von Arabinose bewirkt eine Konformationsänderung von AraC, sodass dieses nun an die O - und I -Stelle bindet. Diese Konformation löst die Transkription des rekombinanten Proteins aus.

beeinflussen noch zwei weitere Faktoren spezifisch die Rate des Proteinabbaus. Ihre Wirkung erzielen diese vermutlich, indem sie die Erkennung der Proteine durch die Abbaumaschinerie verändern.

1. Die Identität der N-terminalen Aminosäure wirkt sich nachdrücklich auf die Halbwertszeit von Proteinen aus. Viele Proteine werden zwar mit Methionin als erster Aminosäure synthetisiert, aber später noch prozessiert. Daher gibt es bei der N-terminalen Aminosäure reifer Proteine eine große Variabilität. Die N-terminale Regel für Stabilität ist in Tabelle 10.2 aufgeführt.
2. Das Vorhandensein bestimmter interner Sequenzen führt zu einer starken Destabilisierung von Proteinen. **PEST-Sequenzen** sind Abschnitte aus zehn bis 60 Aminosäuren, die reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind. Die PEST-Sequenzen bilden Domänen, deren Struktur von proteolytischen Enzymen erkannt wird.

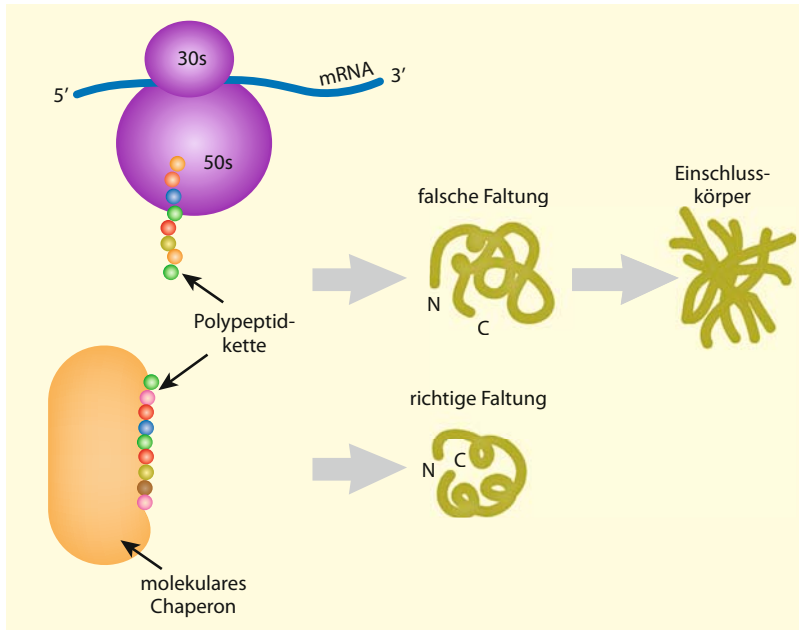
Die N-terminale Sequenz eines Proteins lässt sich relativ einfach gentechnisch verändern. Durch Standardmethoden wie PCR (s. Kap. 4) kann man einen kurzen Abschnitt künstlich synthetisierter DNA einbauen, die einen neuen N-Terminus codiert. Wie

Tabelle 10.2 N-terminale Regel für die Stabilität von Proteinen

N-terminaler Rest	ungefähre Halbwertszeit (Minuten)
Met, Gly, Ala, Ser, Thr, Val	120
Ile, Glu, Tyr	30
Gln, Pro	10
Leu, Phe, Asp, Lys, Arg	2–3

effektiv diese Methode funktioniert, konnte experimentell für β -Galactosidase nachgewiesen werden. Eine interne PEST-Sequenz zu verändern, ohne dabei die Proteinfunktion zu beeinträchtigen, erweist sich als weitaus komplizierteres Unterfangen, obgleich es theoretisch zu einer größeren Stabilität und einem erhöhten Ertrag führen würde.

Ein einigen Fällen falten sich Proteine, die bei korrekter Faltung stabil wären, während der Synthese nicht richtig. Diese falsch gefalteten Proteine bilden Einschlusskörper, dichte Partikel, die mit einem Lichtmikroskop sichtbar sind. Normalerweise bilden



10.6 Molekulare Chaperone tragen dazu bei, die Bildung von Einschlusskörpern zu verhindern

Bei unkorrekter Faltung aggregieren rekombinante Proteine und bilden Einschlusskörper. Wenn während der Translation molekulare Chaperone eine vorzeitige Faltung der rekombinanten Proteine verhindern, faltet sich das neue Polypeptid anschließend richtig und wird voll funktionsfähig.

sich Einschlusskörper, wenn rekombinante Proteine schlecht löslich sind oder zu schnell produziert werden. Unterbinden kann man diese Form der Aggregation beispielsweise durch Bereitstellen **molekularer Chaperone**, die den rekombinanten Proteinen helfen, sich richtig zu falten. Molekulare Chaperone lagern sich während der Translation an Polypeptide an und sorgen dafür, dass das Protein sich nicht vor der vollständigen Translation faltet. Danach kann es die korrekte Faltung einnehmen (Abb. 10.6).

Um die Produktion rekombinanter Proteine zu steigern, kann man die N-terminale Aminosäure ändern, die PEST-Sequenzen entfernen oder das rekombinante Protein zusammen mit molekularen Chaperonen exprimieren, die für eine korrekte Faltung sorgen.

Verbesserung der Proteinsekretion

Synthetisiert eine Bakterienzelle ein rekombinantes Protein, so kann es vorkommen, dass es sich im Cytoplasma wiederfindet, im periplasmatischen Raum zwischen der inneren und äußeren Membran oder

aus der Zelle nach außen ins Kulturmedium abgegeben wird. Die Sekretion durch die innere Cytoplasmamembran wird durch das Vorhandensein einer hydrophoben Signalsequenz am N-terminalen Ende des neu synthetisierten Proteins gesteuert. Die Signalsequenz wird nach dem Export durch eine Signalpeptidase (auch als Leader-Peptidase bezeichnet) abgespalten. Auch wenn Bakterien wie *E. coli* nur wenige Proteine exportieren, existieren spezielle Sekretionssysteme, die einen Export von Proteinen durch beide Membranen ins Kulturmedium ermöglichen.

Ein sezerniertes Protein ist leichter zu reinigen als eines, das zusammen mit der Mehrzahl der bakterienzeleigenen Proteine im Cytoplasma verbleibt. Andererseits sind viele Proteine außerhalb ihrer zellulären Umgebung oder an der Luft instabil. Solche Proteine werden in der Biotechnologie normalerweise nicht verwendet, weil sie schwierig zu reinigen oder zu verwenden sind. Die meisten für praktische Anwendungen ausersehenen Proteine und Enzyme sind außerhalb der Zelle relativ stabil. Ein Standardziel ist deshalb, dass sie sezerniert werden, weil dies die Isolierung und Reinigung sehr erleichtert. Dafür gibt es einige Möglichkeiten:

1. In das klonierte Gen wird eine Signalsequenz eingebaut. Infolgedessen wird das rekombinante Protein eine N-terminale Signalsequenz aufweisen, wenn es neu synthetisiert wird. Dadurch wird sein Export in das Periplasma gesteuert –

mithilfe des **allgemeinen Sekretionssystems**. Anschließend werden die Bakterienzellen geerntet und so behandelt, dass die äußere Membran durchlässig oder ganz entfernt und das rekombinante Protein auf diese Weise freigesetzt wird. Ein wesentliches Problem besteht darin, dass große Mengen eines rekombinanten Proteins die Sekretionsmaschinerie überlasten können und deswegen zu Einschlusskörpern aggregieren. So können sich in der Zelle erhebliche Mengen des rekombinanten Proteins ansammeln, an die immer noch die Signalsequenz gekoppelt ist. Mitunter lässt sich die Sekretion dramatisch erhöhen, indem man größere Mengen der sogenannten Sec-Proteine (Sekretionssystemproteine) bereitstellt. Zusätzliche Kopien der *sec*-Gene können in Plasmide kloniert und exprimiert werden, um die Proteinmenge zu erhöhen. Zudem hat man mutante *E. coli*-Stämme entwickelt, die eine Sekretion ermöglichen.

2. Man kann das rekombinante Protein auch mit einem Bakterienprotein fusionieren, dass normalerweise exportiert wird (s. folgenden Abschnitt über Fusionsvektoren). Das Maltose-bindende Protein von *E. coli* wird effizient in den periplasmatischen Raum exportiert und ist ein beliebter Carrier für rekombinante Proteine. Später wird das rekombinante Protein durch Proteasespaltung vom Carrier-Protein abgelöst. Diese Technik eignet sich besonders für relativ kurze Peptide, darunter viele Hormone und Wachstumsfaktoren, die alleine oft instabil sind.
3. Man kann das interessierende Gen auch in grampositiven Bakterien wie *Bacillus* exprimieren, die keine äußere Membran besitzen. Folglich gelangen exportierte Proteine direkt ins Kulturmedium. Das ist zwar praktisch, aber *Bacillus* hinkt genetisch gesehen noch weit hinter *E. coli* her. Als weitere Alternative kommen tierische Zellen infrage; sie haben nur eine einzige Cytoplasmamembran und sezernieren Proteine daher ebenfalls direkt ins Medium.
4. Eine Sekretion durch beide Membranen gramnegativer Bakterien wie *E. coli* lässt sich durch spezialisierte Exportsysteme erreichen (Abb. 10.7). Die meisten dieser Exportsysteme werden von Natur aus für die Sekretion von Giftstoffen durch pathogene Bakterienstämme genutzt. So überwindet das **Typ-I-Sekretionssystem** die innere und äußere Membran und wird von einigen *E. coli*-Stämmen, die Harnwegsinfektionen hervorrufen, zur Sekretion von Hämolyysin verwendet. Das **Typ-II-Sekretionssystem** überwindet hinge-

gen nur die äußere Membran. Daher wird für den Export ins Medium ein allgemeines Sekretionssystem benötigt (d.h. das Sec-System), um das Protein zunächst durch die innere Membran zu transportieren. Über diesen zweistufigen Prozess verläuft normalerweise die Sekretion von Exotoxin A bei *Pseudomonas*.

Zunehmend werden Stämme von *E. coli* verwendet, die gentechnisch so verändert sind, dass sie diese alternativen Exportsysteme nutzen. In diesen Fällen ist es erforderlich, das zu exportierende Protein so zu modifizieren, dass es durch das gewählte Exportsystem erkannt wird. Wird das Gen mit der entsprechenden Signalsequenz versehen, kann das Protein erkannt und exportiert werden.

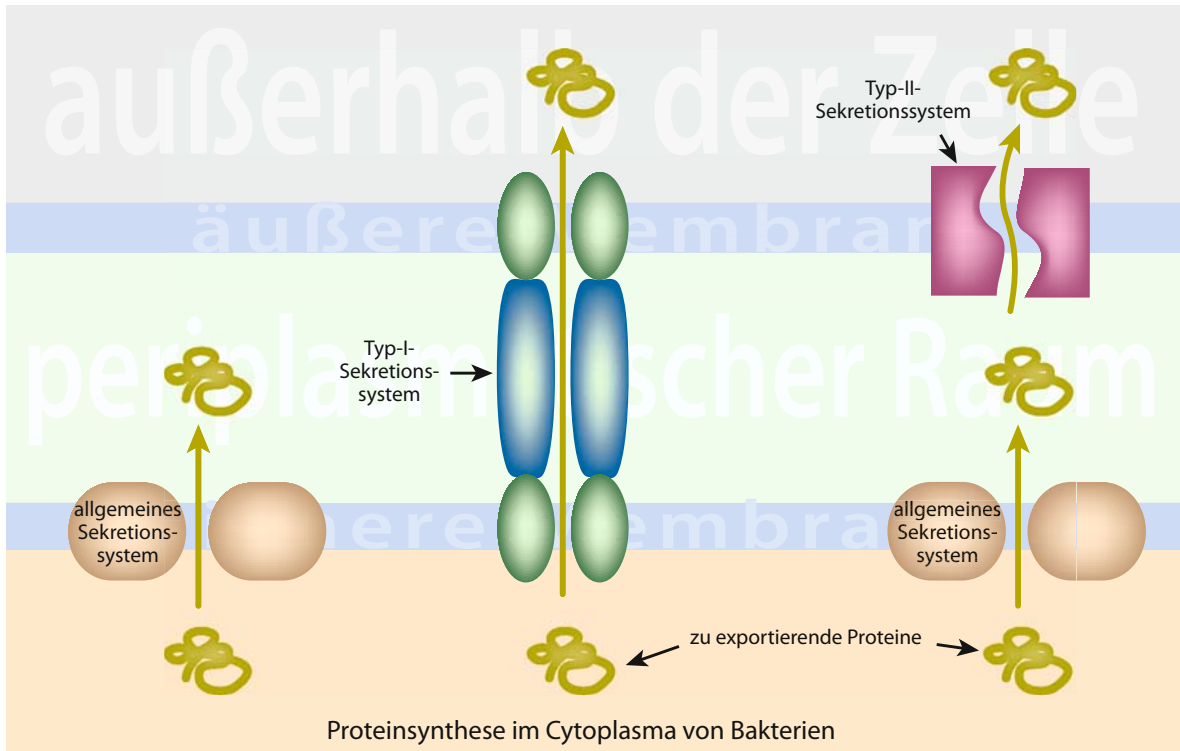
Rekombinante Proteine werden gewöhnlich aus der Zelle ins Kulturmedium exportiert. Für den Export macht man sich die bakteriellen Exportsysteme zunutze.

Fusionsprotein-Expressionsvektoren

Durch Verknüpfung der codierenden Sequenzen zweier Proteine „*in frame*“ (unter Beachtung des Leserasters) ergibt sich ein **Fusionsprotein** (s. Kap. 9). Folglich entsteht bei der Translation ein einzelnes längeres Polypeptid. Wird das erste (N-terminale) Protein normal sezerniert, dann wird auch das Fusionsprotein sezerniert. Auf diese Weise lässt sich der Export eines rekombinanten Proteins bewerkstelligen: Man muss es nur mit einem Protein verknüpfen, das die Zelle normalerweise exportiert.

Durch die Fusion von Proteinen lassen sich auch die Probleme der Stabilität und Reinigung lösen. Viele eukaryotische Proteine sind innerhalb der Bakterienzelle instabil. Das gilt insbesondere für Wachstumsfaktoren, Hormone und regulatorische Peptide, die oftmals zu kurz sind, um sich in eine stabile dreidimensionale Konfiguration zu falten. Wenn man sie jedoch an den C-Terminus eines stabilen Bakterienproteins anhängt, sind sie vor dem Abbau geschützt. Bei sorgfältiger Auswahl des Carrier-Proteins wird auch die Reinigung enorm erleichtert.

Ein **Fusionsproteinvektor** ist ein Plasmid, mit dessen Hilfe man das interessierende Gen an das



10.7 Sekretion durch beide Membranen

An der Proteinsekretion bei *E. coli* ist ein allgemeines Sekretionssystem beteiligt, das eine Signalsequenz erkennt und diese bestimmten Proteine exportiert. Dabei wird das Protein nur in den periplasmatischen Raum transportiert. Typ-I-Sekretionssysteme transportieren das Protein vom Cytoplasma durch den periplasmatischen Raum aus der Zelle hinaus. Typ-II-Sekretionssysteme nehmen Proteine bereits im periplasmatischen Raum auf und transportieren sie durch die äußere Membran.

Gen für ein geeignetes Carrier-Protein koppeln kann. Dieses wird so ausgewählt, dass es sich um ein exportiertes Protein handelt, das leicht zu reinigen ist. Zusätzlich sollte es eine Ribosomenbindungsstelle in der Nähe der Consensussequenz aufweisen und effizient translatiert werden. Eines der besten Beispiele ist das **MalE-Protein** von *E. coli*. Dieses Protein wird im Normalfall in den periplasmatischen Raum exportiert und transportiert dort Maltose von der äußeren zur inneren Membran. Durch Bindung an ein Amyloseharz kann man das MalE-Protein reinigen.

Das interessierende Gen wird stromabwärts „in frame“ mit der für MalE codierenden Sequenz kloniert. Zwischen den codierenden Sequenzen befindet sich eine Proteasespaltungsstelle. Diese ermöglicht eine Spaltung der fusionierten Proteine nach der Synthese und Reinigung. Nach der Proteinexpression werden sämtliche Proteine aus dem periplasmatischen Raum aufgesammelt. Anschließend lässt man

sie durch eine Amylosesäule laufen, um das MalE-Fusionsprotein zu binden. Durch Zusatz der Protease wird das interessierende Protein von MalE und somit von der Säule abgelöst. Schließlich wird die Protease mittels einer anderen Säule, die spezifisch Protease bindet, aus der Proteinprobe entfernt.

Bislang wurde schon eine ganze Reihe von Fusionsproteinsystemen verwendet. Die Verwendung von Peptid-Tags wie His6, FLAG oder GST zur besseren Reinigung von Proteinen wurde bereits angesprochen (s. Kap. 9). Hier interessieren uns ausgefeiltere Proteinfusionen, die eine Sekretion des Fusionsproteins ermöglichen. Ein weiteres effektives Fusions-/ Sekretionssystem verwendet das Periplasmaenzym β -Lactamase. Die β -Lactamase-Domäne bindet an Borat. Dies ermöglicht eine Bindung des Fusionsproteins (und des β -Lactamase-Fragments nach der Spaltung) durch **Phenylboronat**-Harze und die Elution des Fusionsproteins aus dem Harz mit löslichen Boraten.

Ausgefeilte Fusionsproteinvektoren bieten starke, regulierte Promotoren, optimale Ribosomenbindungsstellen sowie ein Fusionsgen für ein sezerniertes Protein. Um den Export des rekombinanten Proteins zu ermöglichen, wird es mit dem sezernierten Protein fusioniert. An der Verbindungsstelle befindet sich eine Proteaseschnittstelle; so kann das rekombinante Protein bei der Reinigung vom Fusionsprotein abgespalten werden.

Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen

Zahlreiche eukaryotische Proteine konnten bereits erfolgreich in Bakterienzellen exprimiert werden. Es gibt jedoch Fälle, in denen es am besten ist, sie in eukaryotischen Zellen zu exprimieren. Das gilt insbesondere für solche Proteine, die nach der Translation noch modifiziert werden müssen.

Nach der Fertigstellung der Polypeptidkette kann es bei Eukaryoten noch zu einer Reihe von Modifikationen kommen (Abb. 10.8). Dazu gehören:

1. chemische Modifikationen, durch die sich in der Polypeptidkette neue Aminosäuren bilden;
2. die Bildung von Disulfidbindungen zwischen passenden Cysteinpartnern (z.B. beim Zusammenbau von Insulin, Kap. 19);
3. Glykosylierung, also die Bindung von Zuckern an bestimmte Stellen des Proteins; viele Zelloberflächenproteine sind glykosyliert und werden nicht richtig in die Membran eingebaut oder funktionieren nicht richtig, wenn die Glykosylkomponente fehlt;
4. Addition verschiedener zusätzlicher Gruppen wie Fettsäureketten, Acetylgruppen, Phosphatgruppen, Sulfatgruppen;
5. Spaltung von Proteinvorstufen; dies kann in mehreren Stufen erfolgen, wie Insulin veranschaulicht (s. Kap. 19); eine solche Spaltung kann für die Sekretion, die korrekte Faltung und/oder die Aktivierung von Proteinen erforderlich sein.

Für die Modifikation und Prozessierung eukaryotischer Proteine sind Enzyme erforderlich, die in Bakterienzellen normalerweise fehlen; deshalb müssen diese Proteine in Eukaryotenzellen exprimiert werden. Meistens finden sich verwandte Verarbeitungsenzyme bei höheren Organismen. Aus diesem Grund muss

die Expression eines Proteins nur selten in seinem Originalorganismus erfolgen. Hier geht es speziell um die Produktion von Proteinen in Zellkulturen. Wie später in den Kapiteln 14 und 15 diskutiert, kann man mittlerweile transgene Tiere oder Pflanzen erzeugen, die in der Lage sind, rekombinante Proteine zu synthetisieren. Als weiterer Vorteil der Expression eukaryotischer Proteine in eukaryotischen Zellen kommt hinzu, dass sich dadurch eine Kontaminierung mit bakteriellen Komponenten vermeiden lässt. Bei der Verwendung von Bakterien für die Proteinproduktion können trotz Reinigung Spuren bakterieller Bestandteile zurückbleiben, die toxisch wirken, Immunreaktionen auslösen oder Fieber hervorrufen.

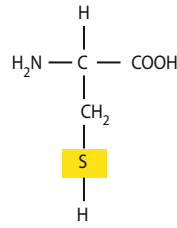
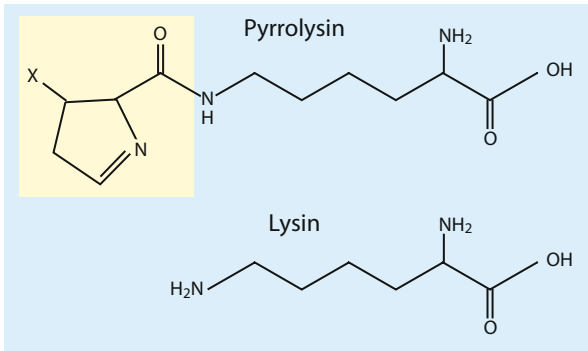
Wie in Kapitel 3 ausgeführt, können Gene mithilfe von Shuttle-Vektoren zwischen verschiedenen Organismengruppen transferiert werden. Weil solche gentechnischen Eingriffe bei Eukaryoten schwieriger sind, handelt es sich bei den meisten Expressionsvektoren für eukaryotische Zellen tatsächlich um Shuttle-Vektoren. Solche Vektoren ermöglichen gentechnische Eingriffe in Bakterien, gewöhnlich *E. coli*, sowie den Transfer zur Genexpression in andere Organismen. Die Expression rekombinanter Proteine soll anhand von Hefe-, Insekten- und Säugetierzellen veranschaulicht werden.

Viele Proteine erfordern spezielle Modifikationen, die nur in eukaryotischen Zellen durchführbar sind.

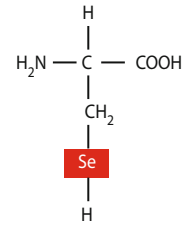
Expression von Proteinen in Hefezellen

Wie bereits erwähnt, wird die Back- oder Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in der Molekularbiologie als einzelliger Modellorganismus verwendet (Kap. 1). Das Hefegenom ist sequenziert, und viele Gene wurden charakterisiert. Aus Sicht der Biotechnologie sprechen noch einige weitere Faktoren für die Verwendung von Hefezellen zur Produktion rekombinanter Proteine.

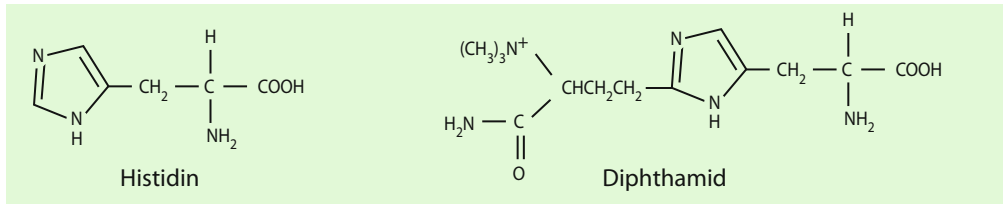
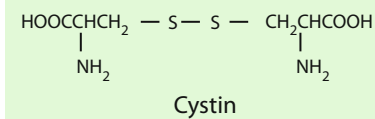
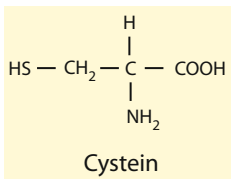
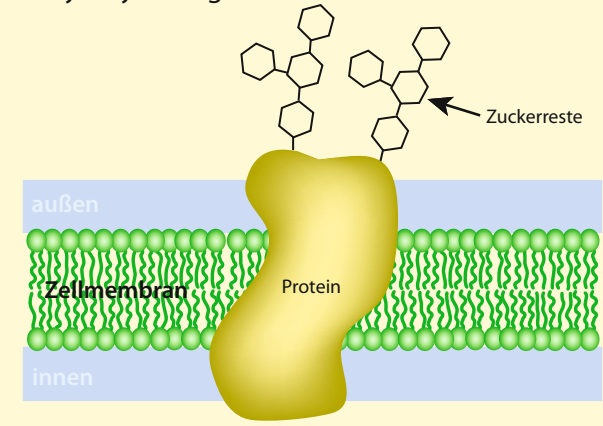
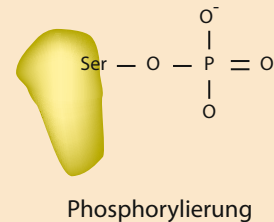
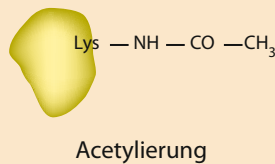
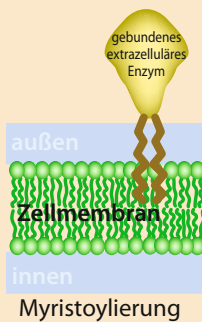
1. Hefe ist sowohl in kleinem Maßstab als auch in großen Bioreaktoren leicht zu züchten.
2. Nach jahrelanger Verwendung zum Brauen und Backen ist Hefe als ungefährlicher Organismus anerkannt. Daher kann man sie ohne spezielle Zustimmung zur Produktion von Arzneimitteln für die menschliche Verwendung einsetzen.

a neue Aminosäuren

Cystein



Selenocystein

**b Disulfidbrücke****c Glykosylierung****d****10.8 Modifikationen von Proteinen bei Eukaryoten**

a Neue Aminosäuren können während der Translation (cotranslational) eingebaut werden (z.B. Pyrrolysine, Selenocystein) oder nach der Translation (posttranslational) durch Modifikation anderer Aminosäuren entstehen (z.B. Diphthamid aus Histidin). **b** Disulfidbrücken verbinden zwei Cysteinmoleküle über ihre Seitenketten. **c** Bei der Glykosylierung werden an der Oberfläche des Proteins Zuckerreste gebunden. **d** Bei einer Myristoylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung werden jeweils unterschiedliche Gruppen an die Aminosäuren eines Proteins angehängt. Durch die Bindung dieser Gruppen ändert sich die Funktion eines Proteins. Bei der Myristoylierung wird das Protein über Fettsäureketten an die Zellmembran gebunden. Acetylierung und Phosphorylierung sorgen oft für eine Aktivierung oder Deaktivierung von Proteinen.

3. Hefe sezerniert normalerweise nur wenige Proteine. Wenn sie durch gentechnische Veränderung nun ein rekombinantes Protein in das Kulturmedium sezerniert, lässt sich dieses relativ problemlos reinigen.
 4. DNA kann nach chemischem oder enzymatischem Abbau der Zellwand oder häufiger durch Elektroporation (s. Kap. 3) in Hefezellen transformiert werden.
 5. Als Startpunkt zur Entwicklung von Klonierungsplasmiden ist ein natürlich vorkommendes Plasmid verfügbar, der sogenannte *2-micron circle*.
 6. Man hat eine Reihe von Hefepromotoren identifiziert, die als Antrieb für die Expression klonierter Gene geeignet sind.
 7. Obwohl es sich bei Hefe um einen primitiven einzelligen Organismus handelt, erfolgen bei ihr dennoch zahlreiche der posttranslationalen Modifikationen, die für eukaryotische Zellen typisch sind, etwa die Bindung von Zuckerresten (Glykosylierung). Allerdings glykosyliert Hefe nur sezernierte Proteine.
- Rekombinante Proteine können so konstruiert werden, dass eine Sekretion durch Hefezellen erfolgt

Exkurs 10.1

Selektion von Säugerzelllinien, die große Mengen rekombinanter Proteine produzieren

Das größte Problem bei der Expression rekombinanter Proteine in Kulturen von Säugetierzellen besteht darin, eine Zelle zu finden, in der das rekombinante Protein in großen Mengen exprimiert wird. Aus dieser einzelnen Zelle muss man dann eine große Zellkultur züchten, sodass das rekombinante Protein in der gesamten Kultur identisch ist. Wird die Zellkultur aus mehr als einer Säugetierzelle hergestellt, kann es vorkommen, dass die Zellen geringfügig abweichende Formen des rekombinanten Proteins synthetisieren. Zur Isolierung einer solchen einzelnen Säugetierzelle werden viele verschiedene Techniken angewendet.

Klonierung durch Grenzwertverdünnung (engl. *limiting dilution cloning*): Nach der Transfektion mit dem Vektor für das rekombinante Protein kommen die Zellen in Lösung. Diese Lösung wird dann in einer Verdünnungsreihe ausplattiert, in einer Dichte von weniger als eine Zelle pro Vertiefung (*well*). Nach Wachstum der Zellen werden geringe Proben des Mediums auf die jeweilige Menge an rekombinantem Protein analysiert (in der Regel mittels ELISA; s. Kap. 6). Zellen mit hoher Produktion werden isoliert und für die Produktion in großen Kulturen gezüchtet.

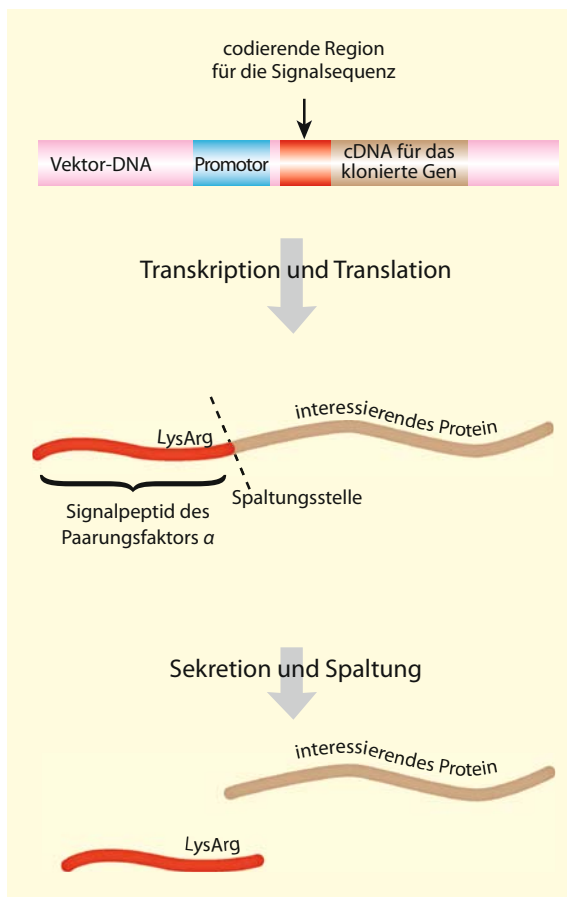
Durchflusscytometrie (engl. *flow cytometry*) und **Zellsortierung**: Zunächst erfolgt eine Transfektion mit dem Vektor für das rekombinante Protein und einem Reportergen (z.B. ein Membranprotein, grün fluoreszierendes Protein oder Dihydrofolat-Reduktase). Die transfizierten Zellen werden dann anhand der Expression des Reportergens mittels Durchflusscytometrie oder FACS (s. Kap. 6) sortiert. In den meisten Fällen korreliert die Menge des Reportergens mit der Menge an rekombinantem Protein. Da hierbei nur die Menge des Reportergens festgestellt wird und nicht die des rekombinanten Proteins, handelt es sich um eine indirekte Methode.

Gelmikrotropfen-Technologie (engl. *gel microdrop technology*): Nach der Transfektion der Zellen mit dem

Vektor für das rekombinante Protein kommen die Zellen in biotinylierte Agarose, also Agarosepolymere, bei denen an bestimmten Stellen der Kette Biotinmoleküle gebunden sind. Diese Biotinseitenketten dienen als Fänger für das sezernierte rekombinante Protein mithilfe von Avidin und einem biotinylierten Fänger-Antikörper. Die Menge des rekombinanten Proteins kann man mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper feststellen. Mit dieser Methode wird tatsächlich die Menge an rekombinantem Protein bestimmt und nicht die eines coexprimierten Reportergens. Durch die Immobilisierung der Zelle in einem Gel lässt sich diese auch leicht isolieren und zu großen Kulturen züchten.

Automatisierte Zellselektion: Zur Identifizierung einer einzelnen Säugetierzelle, die große Mengen eines rekombinanten Proteins produziert, wurden mehrere automatisierte Systeme entwickelt. Mit diesen kann man eine große Zahl transfizierter Zellen sehr effizient analysieren. Bei der lasergestützten LEAP-Methode (engl. *laser-enabled analysis and processing*) werden sämtliche der ursprünglich transfizierten Zellen abgetragen, die nur geringe Mengen Protein produzieren. Diese Zellen werden zunächst in einer Matrix immobilisiert. Anschließend gibt man einen fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen das rekombinante Protein hinzu. Die am hellsten leuchtende Zelle wird markiert, die übrigen werden mittels Laser abgetötet. Ähnlich funktioniert eine weitere Methode mittels sogenannter „automatisierter Koloniepicker“ (engl. *automated colony pickers*). Auch hier werden die transfizierten Zellen immobilisiert und mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen das rekombinante Protein markiert. Die am hellsten leuchtenden Zellen werden selektiert, die übrigen aber nicht abgetötet, sondern die hell leuchtenden mit einem automatisierten Pipettensystem auf eine neue Platte überführt.

(Abb. 10.9). Die Addition eines Signalpeptids stromaufwärts von der codierenden Region markiert das Protein zur Sekretion. Die verwendete Signalsequenz stammt von dem Gen für den Paarungsfaktor α , einem normalerweise sezernierten Protein (s. Kap. 1). Die Signalpeptidase der Hefe erkennt die Sequenz Lys-Arg und spaltet das Signalpeptid ab, nachdem das Protein die Zellmembran passiert hat. Daher müssen die beiden Codons für Lys-Arg unmittelbar stromaufwärts der für das rekombinante Protein codierenden Sequenz positioniert werden, um zu gewährleisten, dass das gentechnisch hergestellte Protein eine korrekte N-terminale Sequenz aufweist.



10.9 Entwicklung von Proteinen zur Sekretion durch Hefezellen

Damit Hefezellen ein interessierendes Protein sezernieren, wird direkt strangaufwärts der codierenden Region ein kleines Signalpeptid angehängt. Die Signalsequenz endet mit der Abfolge Lys-Arg, die von dem Enzym Signalpeptidase erkannt wird. Die Abspaltung erfolgt während der Sekretion hinter dem Arg-Rest.

Für Hefe können verschiedene Vektoren verwendet werden. Diese kann man in drei Klassen einteilen:

1. Plasmidvektoren werden am häufigsten verwendet. Dabei handelt es sich in der Regel um Shuttle-Vektoren, die sich sowohl in *E. coli* als auch in Hefe replizieren können. Das Replikationssystem der Hefe stammt gewöhnlich von dem *2-micron circle* (s. Kap. 1).
2. Vektoren, die in die Hefechromosomen eingebaut werden. Weil Plasmide leicht verloren gehen können, vor allem in besonders großen Kulturen, hat diese Methode den Vorteil, stabil zu sein. Nachteilig ist, dass nur eine einzige Kopie des klonierten Gens vorhanden ist, sofern man nicht Tandem-repeats verwendet. Diese sind jedoch aufgrund von Crossing-over instabil. In der Praxis findet diese Methode nur selten Verwendung.
3. Künstliche Hefechromosomen (engl. *yeast artificial chromosomes*, YAC; s. Kap. 3). Diese werden zur Klonierung und Analyse großer Abschnitte eukaryotischer Genome verwendet. Sie eignen sich jedoch nicht gut als Expressionsvektoren.

Mittlerweile werden mithilfe von *Saccharomyces cerevisiae* verschiedene Proteine zur menschlichen Verwendung produziert, beispielsweise Insulin, Faktor VIIIa (zur Blutgerinnung), mehrere Wachstumsfaktoren und Virusproteine (vom humanen Immundefizienzvirus, Hepatitis B, Hepatitis C etc.). Diese dienen zur Diagnostik oder als Impfstoffe.

Obwohl bereits viele rekombinante Proteine erfolgreich in Hefezellen exprimiert wurden, erhält man meist nur geringe Erträge. Das liegt unter anderem an folgenden Problemen:

1. Verlust von Expressionsvektoren während des Wachstums in großen Bioreaktoren.
2. Vermeintlich sezernierte Proteine werden häufig gar nicht ins Kulturmedium abgegeben, sondern bleiben im Raum zwischen Membran und Zellwand hängen.
3. Häufig kommt es zu einer exzessiven Glykosylierung, sodass an das entstandene Protein zu viele Zuckerreste gebunden sind und es nicht richtig funktionsfähig ist.

Hefen bieten viele Vorteile für die Produktion rekombinanter Proteine. Sie sind echte Eukaryoten, haben Plasmidvektoren und sind schnell und problemlos zu züchten; nicht zuletzt sind ihre Eigenschaften eingehend bekannt.

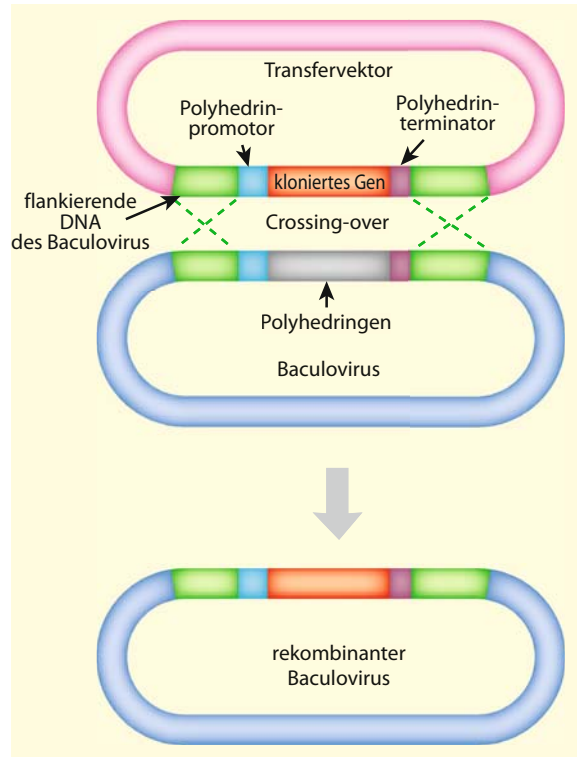
Expression von Proteinen in Insektenzellen

Säugetierzellen sind relativ heikel und haben einen komplexen Nährstoffbedarf. Daher sind sie im Vergleich zu Bakterien- und Hefezellen nur recht schwer und kostspielig zu kultivieren. Insektenzellen erweisen sich in der Kultur jedoch als relativ robust und lassen sich in einfacheren Medien züchten als Säugetierzellen. Folglich hat man Expressionssysteme entwickelt, die auf den Zellen von Insekten beruhen. Diese bieten zudem den Vorteil, dass sie sehr ähnliche posttranslationale Modifikationen bieten, wie man sie in Säugerzellen findet.

Die bei kultivierten Insektenzellen verwendeten Vektoren stammen fast alle von einer bestimmten Virenfamilie, den **Baculoviren**, die ausschließlich Insekten (und verwandte Wirbellose wie Spinnen- und Krebstiere) befallen. Baculoviren sind insofern ungewöhnlich, als dass sie Pakete aus Viruspartikeln bilden, die man als **Okklusionskörper** oder **Polyeder** bezeichnet. Einige infizierte Zellen setzen einzelne Viruspartikel frei, die benachbarte Zellen desselben Insekts infizieren können. Stirbt das infizierte Insekt oder ist bereits tot, werden stattdessen ganze Pakete von Viruspartikeln freigesetzt, die in eine Proteinmatrix eingebettet sind. Das Matrixprotein heißt **Polyhedrin**. Die polyedrische Struktur schützt die Viruspartikel außerhalb ihres Wirtsorganismus. Nach Aufnahme durch ein anderes Insekt wird das Polyhedrin durch Verdauung abgebaut, und der Polyeder fällt auseinander. Dadurch werden die einzelnen Viruspartikel freigesetzt und können die Zellen des neuen Wirtsinsekts befallen.

Das Gen für Polyhedrin zeichnet sich durch einen extrem starken Promotor aus. In einem späten Stadium der Infektion werden riesigen Mengen des Proteins Polyhedrin gebildet. Weil Polyhedrin für die Virusinfektion kultivierter Insektenzellen eigentlich nicht erforderlich ist, kann der Polyhedrinpromotor zur Expression rekombinanter Proteine verwendet werden. Die für Polyhedrin codierende Sequenz wird entfernt und durch eine cDNA ersetzt, die für das zu exprimierende Protein codiert.

Es gibt viele verschiedene Formen von Baculoviren. Am häufigsten verwendet wird das Kernpolyedervirus **MNPV** (engl. *multiple nuclear polyhedrosis virus*). Dieses Virus infiziert viele Insekten und repliziert sich gut in zahlreichen kultivierten Insektenzelllinien. Sehr häufig wird zur Vermehrung dieses Baculovirus eine Zelllinie des Eulenfalters *Spo-*

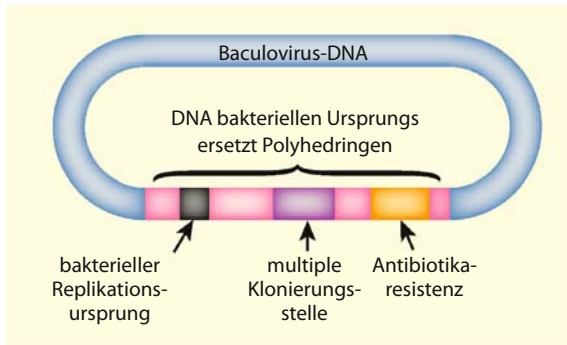


10.10 Ein Baculovirus als Expressionsvektor

Um in Insektenzellen ein Gen zu exprimieren, muss dieses zuvor in das Genom eines Baculovirus eingebaut werden. Dazu kloniert man das interessierende Gen zunächst in einen Transfervektor, der den Promotor für das Polyhedringen des Baculovirus enthält, gefolgt von einer multiplen Klonierungsstelle und dem Polyhedrinterminator. All dies erfolgt in *E. coli*. Anschließend wird das Konstrukt zusammen mit dem normalen Baculovirus-Genom in Insektenzellen transfiziert. Durch ein doppeltes Crossing-over zwischen dem Polyhedrinpromotor und -terminator wird das Polyhedringen durch das interessierende Gen ersetzt.

doptera frugiperda benutzt. In dieser Zelllinie sind die Erträge an Polyhedrin – und damit auch des rekombinanten Proteins, das den Polyhedrin-Promotor verwendet – besonders hoch.

Da ein Virus als Expressionsvektor dient, erfolgt die Konstruktion in zwei Stufen (Abb. 10.10). In der ersten Stufe wird mithilfe eines „Transfervektors“ die cDNA-Version des klonierten Gens übertragen. Als Transfervektor dient ein Plasmid von *E. coli*, das einen Abschnitt MNPV-DNA trägt; dieser enthielt ursprünglich das Polyhedringen und flankierende Sequenzen. Die für Polyhedrin codierende Sequenz wurde durch eine multiple Klonierungsstelle ersetzt.



10.11 Bacmid-Shuttle-Vektor

Bacmide bestehen überwiegend aus einem Baculovirus-Genom mit einem zusätzlichen bakteriellen Replikationsursprung, einer multiplen Klonierungsstelle und einem Antibiotikaresistenzgen. Diese Sequenzen ermöglichen es dem Bacmid, in *E. coli* zu überleben und dennoch Insektenzellen zu infizieren.

Nach dem Einbau steht das klonierte Gen unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors. Bis zu diesem Punkt erfolgt die Konstruktion in *E. coli*. In der zweiten Stufe wird der Abschnitt mit dem klonierten Gen auf das Baculovirus rekombiniert und ersetzt das Polyhedringen. Dazu werden die Insektenzellen sowohl mit dem Transfervektor als auch mit der MNPV-Virus-DNA transfiziert. Durch ein doppeltes Crossing-over entsteht das erforderliche rekombinante Baculovirus.

Weil dieses Vorgehen bisweilen unerwünschte Ergebnisse liefert, hat man noch weitere Insektenvektoren konstruiert. Eine Möglichkeit ist ein Shuttle-Vektor, der sich als Plasmid in *E. coli* repliziert und als Virus in Insektenzellen. Solche Baculovirus-Plasmid-Hybride bezeichnet man als **Bacmide** (Abb. 10.11). Sie bestehen fast aus dem kompletten Baculovirus-Genom, in das ein DNA-Abschnitt aus einem *E. coli*-Plasmid eingebaut ist. Dieser Bereich umfasst einen bakteriellen Replikationsursprung, einen Selektionsmarker und eine multiple Klonierungsstelle (MCS). Der eingebaute Abschnitt ersetzt das Polyhedringen des Baculovirus. Das klonierte Gen ist in die MCS eingebaut und ergibt ein rekombinantes Bacmid. Die Bacmid-DNA wird dann aus *E. coli* gereinigt und in Insektenzellen transfiziert; dort repliziert sie sich als Virus.

Mit dem rekombinanten Baculovirus können dann kultivierte Insektenzellen infiziert werden; innerhalb mehrerer Tage wird das gewünschte Protein synthetisiert. Mithilfe des Baculovirus/Insektenzell-Systems wurden schon mehrere Hundert eukaryoti-

sche Proteine erfolgreich synthetisiert. Die überwiegende Mehrzahl davon war korrekt prozessiert und modifiziert.

Insektenzellen lassen sich leicht für die Herstellung rekombinanter Proteine züchten. Die Zellen werden dann mit einem Virusgenom infiziert, welches das Gen für das rekombinante Protein enthält. Die infizierten Insektenzellen produzieren keine Viruspartikel, sondern rekombinantes Protein.

Proteinglykosylierung

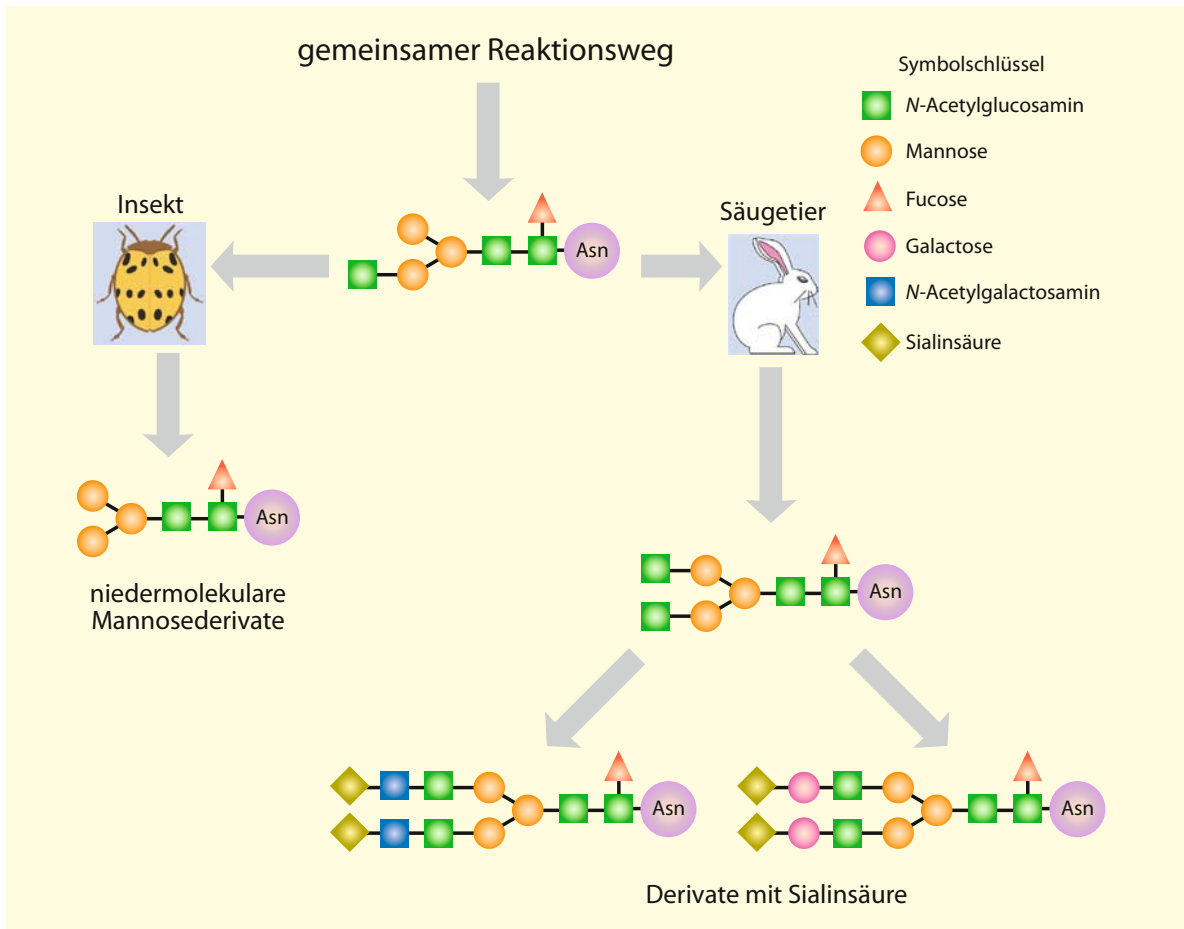
Viele Proteine höherer Organismen sind glykosyliert, das heißt, nach der Translation werden ihnen kurze Ketten von Zuckerderivaten angehängt. Für zahlreiche Proteine ist eine Glykosylierung erforderlich, damit sie ihre biologische Funktion richtig erfüllen können.

Die Expression von Proteinen in Insektenzellen hat unter anderem den Vorteil, dass es hier einen Prozess zur Glykosylierung gibt. Bis zur Addition von Mannose ist der Weg der posttranslationalen Glykosylierung von Asparaginresten bei Säugetieren und Insekten gleich (Abb. 10.12). Danach gabeln sich die Wege allerdings. Dennoch ist eine partielle Glykosylierung besser als gar keine. Zudem sind inzwischen gentechnisch veränderte Insektenzelllinien erhältlich, in denen der vollständige Glykosylierungsweg von Säugetieren exprimiert wird.

In Insektenzellen werden rekombinante Proteine glykosyliert.

Expression von Proteinen in Säugetierzellen

Manche klonierten Gene von Tieren müssen in kultivierten Säugetierzellen exprimiert werden. Dafür gibt es Säugetier-Shuttle-Vektoren, die eine Übertragung eines klonierten Gens von Bakterien auf Säugerzellen ermöglichen (Abb. 10.13). Wie gewöhnlich enthalten solche Vektoren einen bakteriellen Replikationsursprung und ein Antibiotikaresistenzgen, das eine Selektion in Bakterien ermöglicht. Diese Vektoren

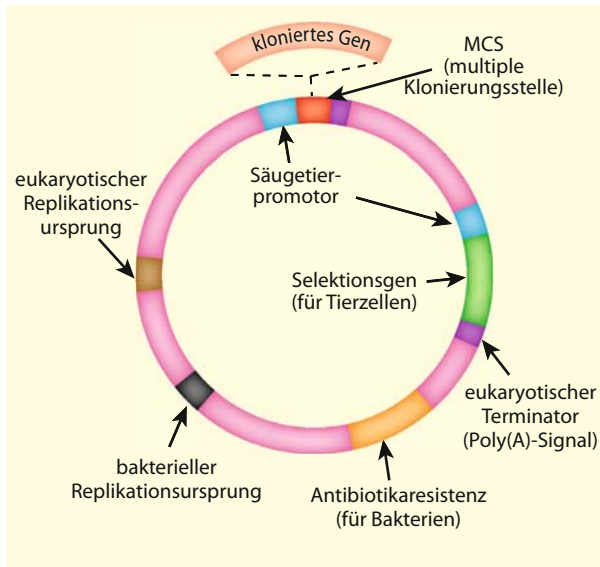


10.12 Wege zur Glykosylierung von Proteinen

Mehrere Schritte bei der posttranslationalen Glykosylierung von Asparaginresten in Proteinen sind bei Säugetieren und Insekten identisch. Die letzten Modifikationen weichen jedoch wie abgebildet voneinander ab. Bei Säugetieren werden vor allem an die Enden der Glykosylketten Sialinsäurereste angehängt, was bei Insekten nicht der Fall ist.

müssen zudem einen Replikationsursprung besitzen, der in Säugetierzellen funktioniert. Dieser stammt in der Regel aus einem Virus, das tierische Zellen infiziert, etwa SV40 (Simian Virus 40). Häufig werden virale Promotoren verwendet, weil diese sehr stark sind und reichliche Mengen Protein produzieren. Alternativ können Promotoren aus Säugetierzellen Verwendung finden, die in großen Mengen exprimiert werden (z.B. die Gene für Metallothionein, Somatotropin oder Aktin). Die multiplen Klonierungsstellen liegen strangabwärts des starken Promotors. Da tierische Gene normalerweise als cDNA kloniert werden, muss der Vektor auch ein Polyadenylierungssignal (also ein Schwanzsignal) am 3'-Ende des eingebauten Gens liefern.

Bei Tierzellen können mehrere Selektionsmarker verwendet werden. Nur sehr wenige Antibiotika wirken tödlich auf tierische Zellen. Das Antibiotikum **Genectin**, auch unter der Bezeichnung **G-418** bekannt, tötet jedoch tierische Zellen ab, indem es die Proteinsynthese blockiert. G-418 ist verwandt mit Antibiotika wie Neomycin und Kanamycin, die gegen Bakterien eingesetzt werden. Das *npt*-(NeoR-) Gen, das für Neomycin-Phosphotransferase codiert, hängt an Neomycin, Kanamycin und G-418 eine Phosphatgruppe an, die diese Antibiotika inaktiviert. Folglich kann man mithilfe von *npt* tierische Zellen unter Verwendung von G-418 selektieren und Bakterienzellen unter Verwendung von Neomycin oder Kanamycin.



10.13 Säugetier-Shuttle-Vektor

Säugetier-Shuttle-Vektoren enthalten einen Replikationsursprung und ein Antibiotikaresistenzgen für das Wachstum in Bakterien. Der Vektor enthält eine multiple Klonierungsstelle zwischen einem starken Promotor und einem Polyadenylierungssignal und zudem einen eukaryotischen Replikationsursprung sowie ein eukaryotisches Selektionsgen wie *npt*.

Da es für Säugetierzellen keine Antibiotika gibt, werden zur Selektion bisweilen mutierte Eukaryotenzellen verwendet, denen ein bestimmtes Enzym fehlt. Das Plasmid trägt dann eine funktionelle Kopie des fehlenden Gens. Diese recht unpraktische Methode wurde sowohl bei Hefezellen als auch bei tierischen Zellen eingesetzt. Bei Hefe wurden Gene für die Aminosäurebiosynthese verwendet (s. Kap. 1). In tierischen Zellen findet manchmal das **DHFR-Gen** Verwendung, das für **Dihydrofolat-Reduktase** codiert. Dieses Enzym ist für die Synthese des essenziellen Cofaktors Folsäure erforderlich und wird von **Methotrexat** inhibiert. Man verwendet Säugetierzellen, denen das **DHFR-Gen** fehlt; über den Shuttle-Vektor wird eine funktionelle Kopie des Gens zur Verfügung gestellt. Die Behandlung mit Methotrexat hemmt DHFR und selektiert somit auf eine hohe Expression des DHFR-Gens auf dem Vektor. Die Methotrexatmenge kann nach und nach erhöht werden, die Folge ist eine Selektion auf einen Anstieg der Kopienzahl des Vektors. (Die chromosomalen **DHFR**-Gene müssen fehlen, um eine Selektion auf chromosomale Duplikationen statt auf den Vektor zu vermeiden.)

Als Alternative kann man auch ein Stoffwechselgen als dominanten Selektionsmarker verwenden. Das Enzym Glutamin-Synthetase schützt Zellen vor dem toxischen Analogon **Methioninsulfoximin**. Der Umfang der Resistenz hängt von der Kopienzahl des Glutamin-Synthetase-Gens ab. Deshalb können Plasmide mit hoher Kopienzahl, die das Gen für Glutamin-Synthetase tragen, selbst in Zellen mit funktionsfähigen chromosomalen Kopien dieser Gene selektiert werden.

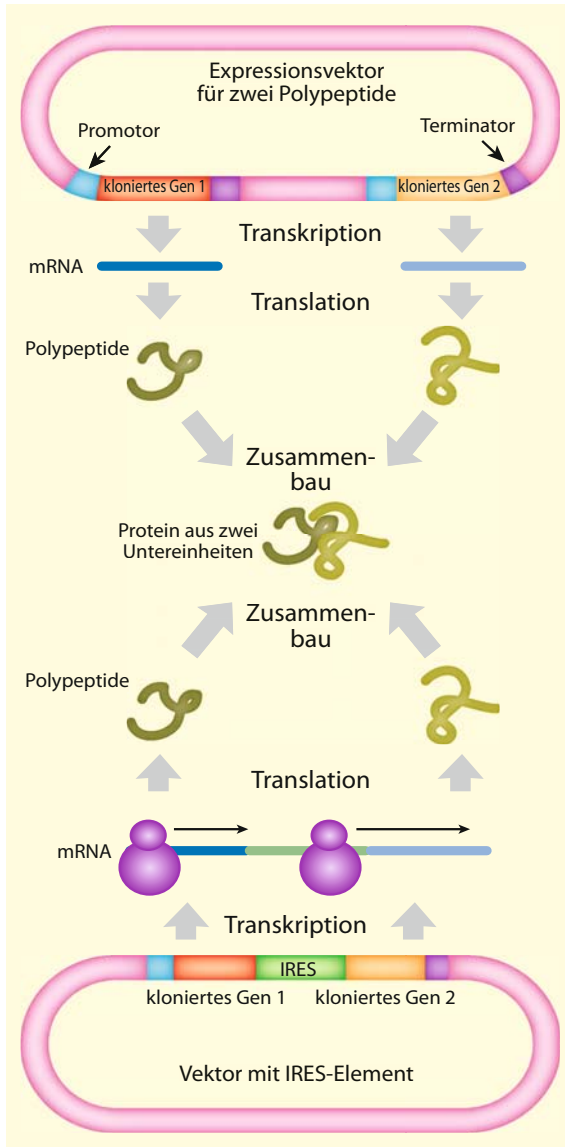
Säugetier-Shuttle-Vektoren besitzen Eigenschaften für die Produktion rekombinanter Proteine in Kulturen von Säugetierzellen.

Weil Antibiotika sich nicht auf Säugetierzellen auswirken, muss das Verbleiben des Shuttle-Vektors in der Zelle mit einer anderen Methode sichergestellt werden. Einige Vektoren besitzen das **DHFR**-Gen, das erforderlich ist, um Säugetierzellen vor Methotrexat zu schützen. Andere Vektoren verwenden das Gen für Glutamin-Synthetase, das die Zelle vor Methioninsulfoximin schützt.

Expression mehrerer Untereinheiten in Säugetierzellen

Weiter verkompliziert wird die Expression rekombinanter Proteine dadurch, dass viele Säugetierproteine aus mehreren Untereinheiten bestehen, die erst in einer Säugetierzelle zusammengebaut werden müssen. Wenn man die einzelnen Untereinheiten in separaten Kulturen herstellt und sie später vermischt, erhält man kein aktives Protein. In diesem Fall kann es notwendig sein, in derselben Zelle mehr als ein Polypeptid zu synthetisieren (Abb. 10.14). Dafür gibt es drei Möglichkeiten:

1. Man verwendet zwei separate Vektoren, von denen jeder das Gen für eine der Untereinheiten trägt.
2. Man verwendet einen einzigen Vektor, der zwei separate Gene für die beiden Untereinheiten enthält; jedes davon wird von einem eigenen Promotor reguliert.
3. Man verwendet einen einzelnen Vektor mit einem künstlichen „Operon“; in diesem Vektor werden die beiden Gene durch denselben Promotor exprimiert. Durch Transkription erhält man eine einzelne polycistronische mRNA, die beide Gene



10.14 Expression mehrerer Polypeptide in derselben Zelle

Manche Proteine bestehen aus zwei Untereinheiten, die nur innerhalb einer Säugetierzelle richtig zusammengebaut werden. Diese kann man in einem Shuttle-Vektor mit zwei verschiedenen Promotoren (blau), zwei multiplen Klonierungsstellen und zwei Polyadenylierungsstellen (violett) exprimieren. Nach Transfektion in eine Säugetierzelle werden beide Proteine exprimiert. Zum Zusammenbau der beiden Proteinuntereinheiten sind bestimmte Zellkomponenten erforderlich. Alternativ kann der Vektor die beiden Gene auch getrennt durch ein IRES-Element (für engl. *internal ribosome entry site*) exprimieren; dies ermöglicht es den Ribosomen, strangaufwärts beider Gene an die mRNA zu binden. Wie zuvor werden die beiden Proteine synthetisiert und zusammengebaut.

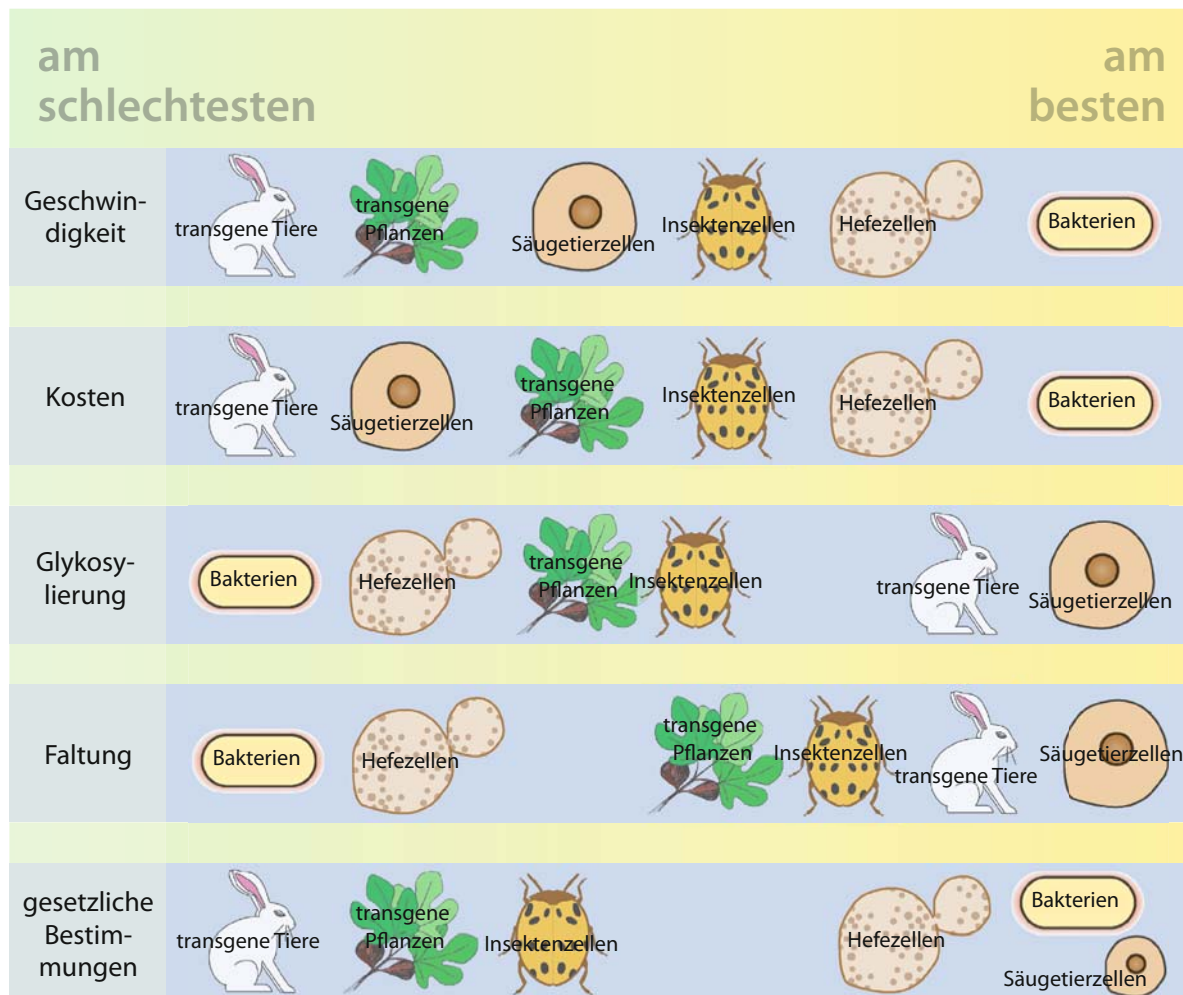
trägt. Wie in Kapitel 2 diskutiert, translatieren eukaryotische Zellen normalerweise nur das erste offene Leseraster einer mRNA. Bestimmte Tierviren besitzen jedoch als **IRES-Elemente** (für engl. *internal ribosomal entry sites*) bezeichnete Sequenzen, die eine Translation mehrerer codierender Sequenzen mit derselben Botschaft ermöglichen. Man beachte, dass die mRNA zweimal von zwei verschiedenen Ribosomen abgelesen wird, die an zwei unterschiedlichen Stellen binden (am normalen 5'-Ende und am IRES-Element). Das ist ein Unterschied zur Translation polycistronischer mRNA bei Bakterien, wo ein einzelnes Ribosom an der mRNA entlang wandert und alle offenen Leseraster des Operons translatiert.

Besteht das rekombinante Protein aus mehreren Untereinheiten, muss jede Untereinheit getrennt synthetisiert werden. Manchmal wird jede Untereinheit von unterschiedlichen Vektoren exprimiert, manchmal enthält ein Vektor separate Gene für jede der Untereinheiten; bei wieder anderen Vektoren werden die Untereinheiten als Operon exprimiert.

Vergleich von Expressionssystemen

Betrachtet man die Kosten, die Geschwindigkeit und die Fähigkeit zur Glykosylierung und Faltung von Proteinen oder auch die gesetzlichen Regelungen, so hat jedes Expressionssystem seine eigenen Stärken und Schwächen. Bakterienzellen bieten die bei weitem preisgünstigste und schnellste Methode zur Expression rekombinanter Proteine, aber sie glykosylieren Proteine nicht und falten die Proteine von Säugetieren auch nicht richtig. In kultivierten Säugetierzellen werden die Proteine glykosyliert und richtig gefaltet, die Kultur verursacht aber hohe Kosten. Die Entscheidung, welches System man zur Expression rekombinanter Proteine verwendet, hängt somit von dem jeweiligen Protein und dessen Eigenheiten ab (Abb. 10.15).

Kein Expressionssystem ist perfekt. Daher muss man jedes rekombinante Protein danach beurteilen, welches System am besten geeignet ist.



10.15 Vergleich von Expressionssystemen für rekombinante Proteine

Jedes Expressionssystem lässt sich bezüglich Geschwindigkeit, Kosten, Glykosylierung, Faltung und gesetzlicher Bestimmungen auf einem Kontinuum von „am schlechtesten“ bis „am besten“ einordnen. Mit transgenen Tieren (Symbol Kaninchen) und transgenen Pflanzen (Symbol Blätter) befassen sich die Kapitel 14 und 15. Die anderen Symbole stehen für kultivierte Säugetierzellen, Insektenzellkulturen, Hefezellen und Bakterien.

► Weiterführende Literatur

Browne SM, Al-Rubeai M (2007) Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol* 25: 425–432

Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Rehm H, Letzel T (2008) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 6. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 115: 113–128

Protein-Engineering

Einführung

Erzeugen von Disulfidbindungen

Andere Möglichkeiten, die Stabilität zu erhöhen

Änderung der Bindungsspezifität

Strukturgerüste

Gerichtete Evolution

Hinzufügen neuer funktioneller Gruppen mithilfe nicht natürlich vorkommender Aminosäuren

Neukombination von Domänen

DNA-Shuffling

Kombinatorische Proteinbibliotheken

Die Herstellung von Biomaterialien beruht auf Protein-Engineering

Gentechnisch hergestellte Bindungsproteine

Weiterführende Literatur

Einführung

Schon vor Einzug der Gentechnik wurden zahlreiche Enzyme industriell genutzt. Allerdings machen lediglich wenige Dutzend Enzyme über 90 % der industriellen Enzymnutzung aus. Einige der bekanntesten Beispiele sind in Tabelle 11.1 aufgelistet. Der Einsatz dieser Proteine erfolgt unter relativ rauen, oxidierenden Bedingungen, wie sie in lebenden Zellen nicht herrschen. Infolgedessen sind gerade diese Proteine außergewöhnlich robust und stabil und in dieser Hinsicht keineswegs repräsentativ für typische Enzyme. Auffallenderweise handelt es sich bei den meisten davon um **Hydrolasen**, die entweder Kohlenhydratpolymere oder Proteine abbauen.

Drei Faktoren haben dazu geführt, dass sich das Spektrum industriell genutzter Enzyme deutlich erweitert hat. Erstens wurden durch die moderne Biologie zahlreiche neue enzymkatalysierte Reaktionen ermittelt, die potenziell für die Industrie nutzbar sind. Zweitens ist man heute, wie im vorherigen Kapitel ausgeführt, in der Lage, mithilfe von Genklonierung und Expressionssystemen Proteine in großen Mengen herzustellen. Drittens kann man die Sequenz der Proteine selbst gentechnisch verändern und dadurch ihre Eigenschaften verbessern. Man spricht in diesem Zusammenhang vom sogenann-

ten **Protein-Engineering**. Das ist das Thema dieses Kapitels.

Methoden zur Manipulation von DNA-Sequenzen und zur Expression der dadurch codierten Proteine wurden bereits in den vorigen Kapiteln erläutert. Daher werden diese Einzelheiten hier ausgespart. Es soll vielmehr darum gehen, welche Möglichkeiten es gibt, die biologischen Eigenschaften von Proteinen zu verändern. In der Praxis hat man beim Protein-Engineering bisher weitgehend darauf abgezielt, stabilere Varianten nützlicher Enzyme zu erzeugen. Das Ziel lautet, Proteine so herzustellen, dass sie unter industriellen Bedingungen verwendet werden können, ohne dabei denaturiert zu werden und ihre Aktivität einzubüßen. Man kann Proteine jedoch auch so manipulieren, dass sich die Spezifität ihrer Enzymaktivität verändert oder sogar neue Enzymaktivitäten erzeugt werden. Irgendwann wird es vielleicht möglich sein, Proteine nach grundlegenden Prinzipien neu zu konstruieren. Dies setzt voraus, aus der Polypeptidsequenz die dreidimensionale Proteinstruktur vorhersagen zu können.

Viele Enzyme werden von der biotechnologischen Industrie genutzt, oft unter rauen Bedingungen. Zunehmend besteht Bedarf an neuen und robusteren Enzymen.

Tabelle 11.1 Wichtige industriell genutzte Proteine

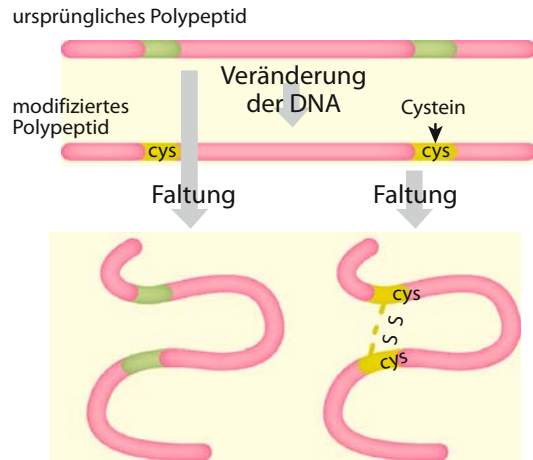
Protein	Funktion
Amylasen	Hydrolyse von Stärke beim Brauen
Lactase	Hydrolyse von Lactose bei der Milchverarbeitung
Invertase	Hydrolyse von Saccharose
Cellulase	Hydrolyse von Cellulose aus Pflanzenmaterial
Glucose-Isomerase	Umwandlung von Glucose zu Fructose für Sirups mit hohem Fructosegehalt
Pektinase	Hydrolyse von Pektinen zur Klärung von Fruchtsäften etc.
Proteasen (Ficin, Bromelain, Papain)	Hydrolyse von Proteinen zum Zartmachen von Fleisch und zur Klärung von Fruchtsäften
Lab	zur Käseherstellung verwendete Protease
Glucose-Oxidase	Antioxidans in Fertignahrungsmitteln
Katalase	Antioxidans in Fertignahrungsmitteln
Lipasen	Lipidhydrolyse bei der Herstellung von Käse und anderen Nahrungsmitteln

Erzeugen von Disulfidbindungen

Die Ausbildung von Disulfidbindungen ist ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur zahlreicher Proteine. Besonders ausschlaggebend sind Disulfidbindungen oder Disulfidbrücken für Proteine außerhalb der Zelle in einer oxidierenden Umgebung. In der Praxis sind die meisten industriell genutzten Enzyme solchen oxidierenden Bedingungen ausgesetzt. Deshalb kommt Disulfidbindungen eine besondere Relevanz zu.

Durch das Einführen zusätzlicher Disulfidbindungen lässt sich die Stabilität von Proteinen relativ problemlos erhöhen. Als erster Schritt werden in die Polypeptidkette einfach zwei Cysteinreste eingebaut. Unter oxidierenden Bedingungen wird sich dazwischen eine Disulfidbindung ausbilden – vorausgesetzt, die Polypeptidkette faltet sich so, dass die beiden Cysteinreste in engen Kontakt miteinander kommen. Damit dies funktioniert, muss man natürlich die Tertiärstruktur des Proteins kennen, sodass die Cysteine an den richtigen Stellen eingebaut werden können (Abb. 11.1). Allgemein lässt sich sagen: Je länger die Schleife aus Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen, desto größer der Zuwachs an Stabilität. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Ausbildung einer Disulfidbindung zu einer spannungsreichen Konformation führen kann, wenn die beiden Cysteinreste nicht passend zueinander ausgerichtet sind. Dies wiederum kann die Stabilität des Proteins verringern.

Veranschaulicht wurde diese Methode an dem Enzym Lysozym aus dem Bakteriophagen T4. Die Struktur dieses Enzyms hat man durch Röntgenkristallographie ermittelt. Die 164 Aminosäuren lange Polypeptidkette faltet sich zu zwei Domänen und enthält zwei Cysteinreste, die beim Wildtypprotein nicht an der Ausbildung einer Disulfidbindung beteiligt sind. Zunächst wandelte man den Rest Cys54 durch Mutation in Thr um, um die Ausbildung ungeeigneter Disulfide zu vermeiden. Der zweite Rest, Cys97, sollte zur Ausbildung einer Disulfidbindung verwendet werden. Zunächst führte man ausführliche Analysen zu möglichen Positionen für Disulfidbrücken durch. Auf diese Weise schloss man solche Disulfidbindungen aus, die andere stabilisierende Wechselwirkungen innerhalb des Proteins beeinträchtigen könnten. Es blieben drei mögliche Disulfidbindungen, die theoretisch die Stabilität erhöhen sollten: zwischen den Positionen 3 und 97, 9 und 164 sowie 21 und 142 (Abb. 11.2).



11.1 Ausbildung von Disulfidbindungen

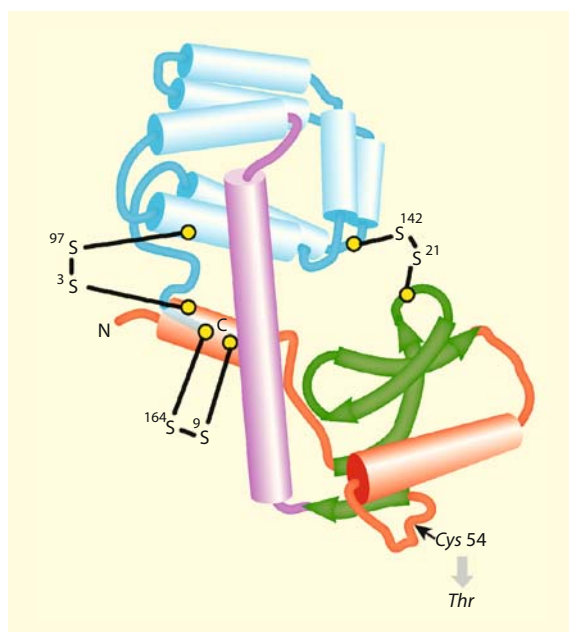
Um in ein Protein eine Disulfidbindung einzuführen, muss man durch ortsspezifische Mutagenese zwei Aminosäurereste in Cysteine verwandeln. Unter oxidierenden Bedingungen bildet das so manipulierte Protein dann zwischen den beiden Cysteinresten eine Disulfidbindung aus, die das Protein an dieser Stelle zusammenhält.

Um dies experimentell zu überprüfen, wandelte man fünf Aminosäuren (Ile3, Ile9, Thr21, Thr142 und Leu164) in verschiedenen Kombinationen in Cys-Reste um. Man überprüfte manipulierte Proteine mit jeweils einer der Disulfidbindungen, aber auch solche mit zwei oder drei Disulfidbrücken, auf ihre Stabilität und Enzymaktivität (Tabelle 11.2). Die Stabilität wurde anhand der Hitzedenaturierung gemessen. Die **Schmelztemperatur, T_m** , ist jene Temperatur, bei der 50 % des Proteins denaturiert vorliegen. Zwar erhöhten alle drei Disulfidbindungen die Stabilität des T4-Lysozyms, aber die manipulierte Proteine mit der 21–142-Disulfidbindung büßten ihre Enzymaktivität ein. Woran das genau lag, ist nicht bekannt, vermutlich wirkte sich jedoch eine Verzerrung der Struktur auf das aktive Zentrum aus. Das manipulierte Protein mit den beiden anderen Disulfidbindungen zeichnete sich jedoch durch einen enormen Anstieg der Stabilität aus, und auch die Enzymaktivität blieb weitgehend erhalten. Insgesamt gesehen ist diese Methode ausgesprochen effektiv.

Durch Einführen zusätzlicher Disulfidbindungen, mittels einer Veränderung der codierenden Sequenz für ein Enzym, lässt sich die Stabilität eines Proteins oft enorm erhöhen.

Tabelle 11.2 Stabilisierung von T4-Lysozym durch Disulfidbindungen

Protein	vorhandene Disulfidbindungen			Stabilität (T _m)	Aktivität (%)
	3-97	9-164	21-142		
unverändert	–	–	–	41,9	100
1	+	–	–	46,7	96
2	–	+	–	48,3	106
3	–	–	+	52,9	0
4	+	+	–	57,6	95
5	–	+	+	58,9	0
6	+	+	+	65,5	0



11.2 Konstruktion von Disulfidbindungen bei Lysozym von T4

Das Lysozym von T4 besteht aus zwei Domänen: Die N-terminale Region ist grün und rot dargestellt, die C-terminale Region blau. Verbunden sind die beiden Domänen durch eine α -Helix (violett). An drei Stellen des Lysozyms führte man Disulfidbindungen ein, um dessen Stabilität zu erhöhen. Die erste Disulfidbindung bildete sich zwischen den Positionen 9 und 164. Dadurch wird die erste α -Helix am N-Terminus mit dem C-terminalen Schwanz verbunden. Die zweite Disulfidbrücke befindet sich zwischen den Positionen 2 und 97 und verbindet die N- und C-terminale Domäne. Die dritte Disulfidbindung verknüpft Position 21 in der N-terminalen Domäne mit 142 in der C-terminalen Domäne. In der Abbildung sind α -Helices in Form von Röhren, β -Faltblätter als grüne Pfeile dargestellt.

Andere Möglichkeiten, die Stabilität zu erhöhen

Am einfachsten und effektivsten lässt sich die Stabilität eines Proteins durch zusätzliche Disulfidbindungen erhöhen. Es gibt jedoch auch noch einige weitere Möglichkeiten. Die Auswirkungen der Entropie haben zur Folge, dass sich ein Protein umso eher aufalten wird, je größer die Zahl möglicher ungefalteter Konformationen ist. Daher lässt sich die Stabilität steigern, indem man die Zahl möglicher ungefalteter Konformationen verringert. Neben dem Einbau zusätzlicher Disulfidbindungen, wie zuvor beschrieben, bestehen dazu noch einige weitere Möglichkeiten. Die Aminosäure Glycin hat bezüglich ihrer Konformation mehr Freiheiten als jede andere Aminosäure, weil sie als Rest lediglich ein Wasserstoffatom aufweist. Prolin hingegen hat aufgrund seiner starren Ringstruktur die wenigste konformationelle Freiheit. Daher kann man die Stabilität einer Polypeptidkette steigern, indem man Glycin durch eine andere Aminosäure ersetzt oder die Zahl der Prolinreste erhöht. Man sollte jedoch unbedingt vermeiden, durch solche Austausche die Struktur des Proteins zu verändern, vor allem in entscheidenden Regionen. In experimentellen Tests lieferten solche Änderungen einen geringfügigen Zuwachs an Stabilität.

Da hydrophobe Reste Wasser abstoßen, lagern sie sich zumeist im Zentrum des Proteins zusammen und meiden dessen äußere Oberfläche. Daher sollte man die Stabilität erhöhen können, indem man bestehende Lücken in dem hydrophoben Kern füllt. Dazu kann man beispielsweise kleinere hydrophobe Reste, die sich bereits im Zentrum oder in dessen Nähe

befinden, durch größere ersetzen. Dies ließe sich beispielsweise durch einen Austausch von Ala gegen Val oder von Leu gegen Phe realisieren. Bei den meisten Proteinen ist der hydrophobe Kern bereits recht stabil und weist nur wenige Lücken auf. Zudem führt der Einbau größerer hydrophober Aminosäuren zum Füllen dieser Lücken oft dazu, dass sich ihre Seitenketten zu ungünstigen Konformationen verdrillen. Dies hebt jeglichen Stabilitätsgewinn durch den dichter gepackten hydrophoben Kern wieder auf.

Die α -Helix ist aufgrund ihrer asymmetrischen Struktur ein Dipol mit leicht positiver Ladung an ihrem N-terminalen Ende und einer leicht negativen Ladung am C-terminalen Ende. Befinden sich in der Nähe der Enden einer α -Helix Aminosäuren mit entgegengesetzten Ladungen, erhöht sich die Stabilität. In natürlich vorkommenden Proteinen sind die meisten α -Helices auf diese Weise stabilisiert. Fehlen solche stabilisierenden Reste jedoch, kann man sie durch Protein-Engineering erzeugen.

Asparagin- und Glutaminreste sind relativ instabil. Bei hohen Temperaturen oder extremen pH-Werten werden diese Amide in ihre entsprechenden Säuren Asparaginsäure und Glutaminsäure umgewandelt. Das Ersetzen der neutralen Amide durch die negativ geladenen Carboxyle kann die Struktur bzw. Aktivität des Proteins zerstören. Vermeiden lässt sich dies durch ein entsprechendes Protein-Engineering, bei dem man Asn oder Glu gegen einen ungeladenen hydrophilen Rest vergleichbarer Größe wie Thr austauscht.

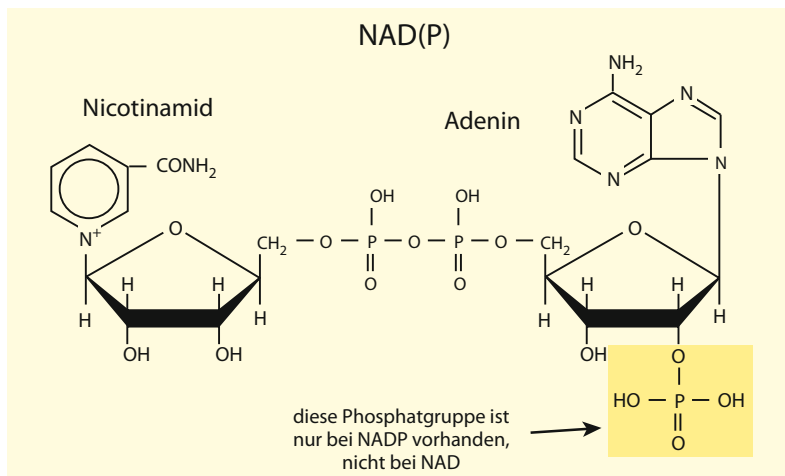
Durch zahlreiche Veränderungen der Aminosäuresequenz lässt sich die Stabilität von Proteinen leicht erhöhen.

Änderung der Bindungsspezifität

Neben der Stabilität eines Proteins insgesamt kann man auch gezielt das aktive Zentrum verändern. Am unkompliziertesten sind Veränderungen, welche die Bindungsspezifität für das Substrat oder einen Cofaktor ändern, sich aber nicht auf den enzymatischen Mechanismus auswirken. Sinnvoll kann die Änderung der Spezifität für einen Cofaktor oder ein Substrat sein, um das Produkt einer Enzymreaktion weniger kostspielig zu machen oder es chemisch zu verändern.

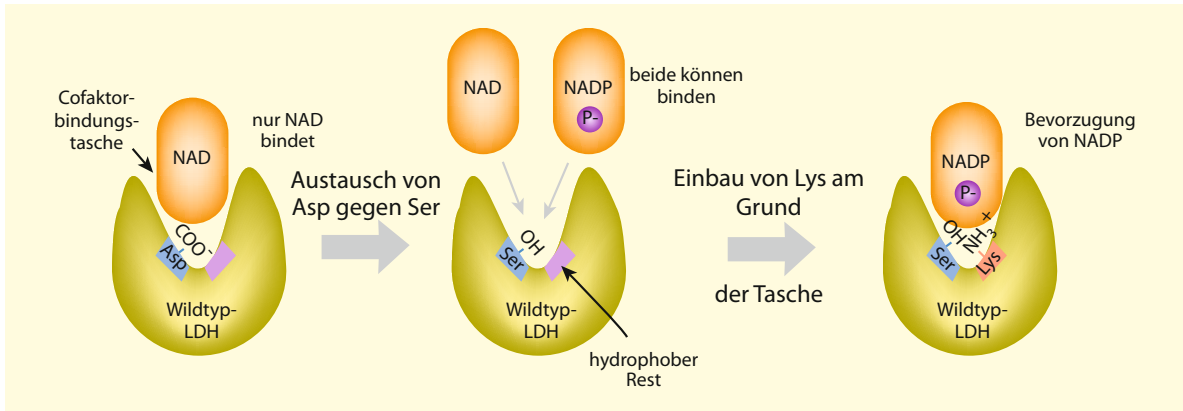
Gezeigt wurde dieses Prinzip anhand mehrerer Enzyme, die mithilfe der Cofaktoren **NAD** oder **NADP** Dehydrierungsreaktionen katalysieren. Beide Cofaktoren tragen Reduktionsäquivalente und reagieren über denselben Mechanismus. Die meisten Enzyme nutzen jeweils nur einen dieser beiden Cofaktoren, einige wenige können NAD oder NADP nutzen. NAD wird im Allgemeinen von **Dehydrogenasen** in Abbaureaktionen verwendet, das entstehende NADH wird dann in der Atmungskette oxidiert. Biosyntheseenzyme nutzen hingegen NADP. Der strukturelle Unterschied von NADP besteht lediglich in einer zusätzlichen Phosphatgruppe am Ribosering (Abb. 11.3). Dadurch erhält NADP eine zusätzliche negative Ladung. Es ist nicht überraschend, dass Enzyme, die NADP bevorzugen, eine etwas größere Bindungstasche mit positiv geladenen Aminosäureresten am Grund aufweisen. Enzyme, die NADH bevorzugen, haben an der entsprechenden Stelle häufig negativ geladene Aminosäuren.

Bei mehreren Enzymen, die NAD oder NADP nutzen, hat man durch eine entsprechende Manipula-



11.3 Unterschied in der Struktur von NAD und NADP

NAD (Nicotinamidadenindinucleotid) unterscheidet sich von NADP nur durch eine einzelne Phosphatgruppe (gelb).



11.4 Änderung der Cofaktorpräferenz von Lactat-Dehydrogenase

Lactat-Dehydrogenase (LDH) bindet bevorzugt NAD, weil die Bindungstasche einen Aspartatrest enthält. Die negativ geladene Carboxylgruppe stößt das negativ geladene Phosphat von NADP ab. Nach Austausch des Aspartatrestes gegen Serin kann sowohl NAD als auch NADP an LDH binden. Fügt man zusätzlich noch ein positiv geladenes Serin hinzu, wird die Tasche attraktiver für NADP.

tion diese Präferenz geändert. Beispielsweise verwendet die **Lactat-Dehydrogenase (LDH)** der meisten Bakterien reduziertes NAD statt NADP zur Umwandlung von Pyruvat in Lactat. Ein konservierter Aspartatrest liefert die negative Ladung am Grund der Bindungstasche für den Cofaktor; diese schließt NADP aus. Tauscht man diesen Rest gegen einen neutralen Rest wie Serin aus, kann das Enzym sowohl NADP als auch NAD nutzen. Wird zusätzlich ein benachbarter hydrophober Rest in der Cofaktorbindungstasche durch einen positiv geladenen Aminosäurerest (wie Lysin oder Arginin) ersetzt, bevorzugt das Enzym nun NADP gegenüber NAD (Abb. 11.4).

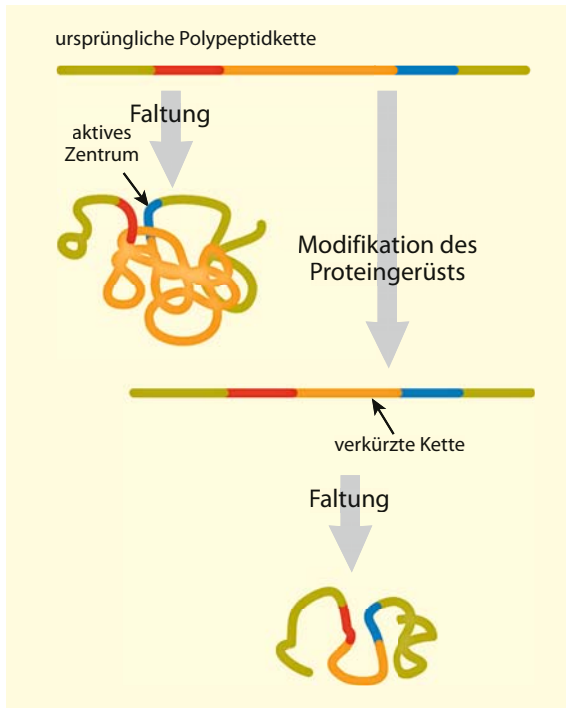
Auf ähnliche Weise kann man die Spezifität von LDH für ihr Substrat ändern. Das natürliche Substrat Lactat ist eine Hydroxysäure mit drei Kohlenstoffatomen. Man kann mehrere Reste in der Umgebung der Substratbindungsstelle austauschen, ohne dadurch den Reaktionsmechanismus des Enzyms zu beeinträchtigen. Durch den Austausch zweier Alanin- gegen zwei Glycinreste wird die Bindungsstelle größer. Ersetzt man hydrophile Reste (Lys, Gln) durch hydrophobe (Val, Met), wird die Bindungsstelle hydrophober. Bei Änderung mehrerer Reste erhält man eine manipulierte LDH, die fünf oder sechs Kohlenstoffanaloga von Lactat aufnehmen und als Substrat nutzen kann.

Durch den Austausch von Aminosäuren im oder um das aktive Zentrum kann man die Substratspezifität eines Enzyms ändern.

Strukturgerüste

Am aktiven Zentrum sind letztendlich relativ wenige Aminosäurereste eines Proteins beteiligt. Der größte Teil des Proteins bildet die dreidimensionale Plattform, das erforderliche Gerüst, um die Reste im aktiven Zentrum in die richtige Position zu bringen. Vielfach ist dieses Gerüst sehr viel größer als wirklich erforderlich. Beispielsweise enthält die β -Galactosidase von *Escherichia coli* (LacZ-Protein) ungefähr 1000 Aminosäurereste, während die einfachsten hydrolytischen Enzyme lediglich aus 200 bis 300 Resten bestehen. Daher sollte es eigentlich möglich sein, eine funktionelle β -Galactosidase zu konstruieren, die nur ein Viertel oder ein Drittel so groß ist wie das LacZ-Protein. Aus industriellen Gesichtspunkten wäre ein solches kleineres Protein natürlich sehr viel effizienter.

Das Konzept, von nützlichen Proteinen lediglich die Region des aktiven Zentrums zu nutzen, wurde bereits beim Antikörper-Engineering angewandt, wie in Kapitel 6 erläutert. Zusätzlich hat man mit der Technik des Phagen-Display (s. Kap. 9) relativ kurze Peptide zur Bindung an eine Vielzahl von Zielmolekülen selektiert. Ist eine solche Bindungsdomäne selektiert, kann man sie in ein anderes Protein einbauen. Solche Techniken werden es ermöglichen, kleinere Proteine zu konstruieren, deren Biosynthese weniger Energie und Material verbraucht (Abb. 11.5).



11.5 Verkleinerung des Proteingerüsts

Proteine weisen außerhalb des aktiven Zentrums (blau/rot) oft große Strukturdomänen auf. Diese Domänen kann man so modifizieren, dass sie kleiner werden (wodurch sich oft die Menge an exprimiertem Protein erhöht) oder sich das Protein einfacher isolieren und reinigen lässt.

Viele Proteine sind aus industrieller Sicht größer als notwendig. Durch Eliminieren überflüssiger Sequenzen und Vereinfachung des Proteins könnte sich die Effizienz für die Industrie steigern lassen.

Gerichtete Evolution

Für die bisher beschriebenen Techniken des Protein-Engineering muss man die Proteinstruktur kennen und detaillierte Kenntnisse über die Funktionsweise des aktiven Zentrums haben. Bislang wurden jedoch nur sehr wenige Enzyme derart eingehend erforscht. Eine mächtige Technik zur Änderung der Funktion eines Enzyms, ohne dafür vollständige Daten zu Struktur und Funktion zu haben, ist die **gerichtete Evolution**. Durch gerichtete Evolution kann man beispielsweise die Substratspezifität ändern: Indem man

entweder das Enzym so verändert, dass es ein völlig anderes Substrat erkennt, oder durch geringfügige Änderungen ein etwas anderes Substrat zugänglich macht. Die wichtigste Voraussetzung für eine gerichtete Evolution ist die zufallsbedingte Mutagenese des interessierenden Gens und eine nachfolgende Selektion der erwünschten neuen Funktion. Wie bereits in Kapitel 5 beschrieben, werden nach einem ähnlichen Prinzip neue Ribozyme isoliert.

Bei der gerichteten Evolution erfolgt ein Screening nach neuen Enzymaktivitäten; dazu erstellt man eine Bibliothek verschiedener Enzyme, die alle von dem gleichen Ausgangsprotein abstammen. Aufgrund von zufallsbedingter Mutagenese weicht jedes Protein der Bibliothek leicht von den anderen ab. Zufallsmutanten können über die gesamte Länge der Gensequenz erzeugt werden. Alternativ kann man bestimmte Aminosäuren gezielt durch zufällig ausgewählte ersetzen. Die dritte häufig angewendete Methode zur Erzeugung von Mutanten beruht auf (homologer oder nichthomologer) Rekombination. Diese mutierten Gene werden dann nach Einbau in einen geeigneten Expressionsvektor und eine Wirtszelle auf die neue, erwünschte Enzymaktivität hin untersucht.

Ausgangspunkt der zufallsbedingten Mutagenese bildet in der Regel ein Gen, dessen Funktion der erwünschten Funktion recht nahe kommt. Mithilfe der sogenannten **error prone-PCR** (epPCR) werden entlang der gesamten Sequenz des Gens zufällige Mutationen eingeführt. Fehler bei der PCR-Amplifikation lassen sich durch verschiedene Methoden induzieren. Am einfachsten ist es, die PCR-Reaktion unter Anwesenheit von $MnCl_2$ ablaufen zu lassen. *Taq*-Polymerase baut das falsche Nucleotid mit recht hoher Rate ein, und $MnCl_2$ stabilisiert die Basenfehlpaarungen. In den nachfolgenden Amplifikationsrunden wird dieser Fehler dann kopiert. Durch Hinzufügen von Nucleotidanaloga wie 8-oxo-dGTP und dITP, die Fehlpaarungen auf dem entgegengesetzten Strang bilden, kann man die Fehlerrate bei der PCR ebenfalls erhöhen. In Kombination mit $MnCl_2$ können diese Analoga sehr viele unterschiedliche Mutationen entlang eines Gens auslösen. Einige zufallsbedingte Mutationen, die außerhalb des aktiven Zentrums erfolgen, können subtile Veränderungen hervorrufen, die sich aber nachdrücklich auf die Substraterkennung und Enzymfunktion auswirken.

Viel stärker im Fokus steht die gezielte Mutagenese. Diese erfordert allerdings einige Kenntnisse über die Struktur des Enzyms und des aktiven Zentrums. So hat man beispielsweise **Tyrosyl-tRNA-Synthetase** aus *Methanococcus jannaschii* durch gerichtete

tete Evolution mutiert. Das Gen für dieses Enzym wurde sequenziert, es lagen aber keinerlei Strukturdaten vor. Durch einen Vergleich der Sequenz mit der einer anderen Tyrosyl-tRNA-Synthetase mit bekannter Struktur ermittelten die Wissenschaftler, welche Aminosäuren potenziell an der Erkennung von Tyrosin beteiligt sein könnten. Diese Reste unterzogen sie dann einer zufallsbedingten Mutagenese. Durch eine Änderung von Resten mit bekannter Funktion bei der Substraterkennung wird man eher eine nachdrückliche Wirkung erzielen.

Die dritte Methode zur Bildung neuer Enzyme durch gerichtete Evolution beinhaltet verschiedene Maßnahmen zur Rekombination unterschiedlicher Domänen. Diese beruhen auf homologen oder nichthomologen Sequenzen und umfassen eine Reihe unterschiedlicher Abläufe, darunter DNA-Shuffling und kombinatorische Proteinbibliotheken. Auf einige davon wird später noch detaillierter eingegangen.

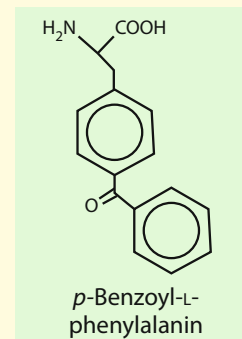
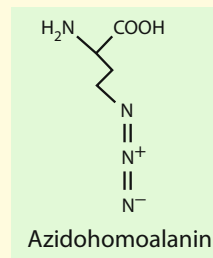
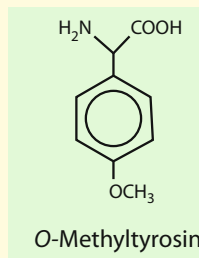
Proteine können auch durch gerichtete Evolution verändert werden. Diese besteht aus einer zufallsbedingten Mutagenese der codierenden Sequenz und einer nachfolgenden biologischen Selektion auf verbesserte oder neue Eigenschaften.

Hinzufügen neuer funktioneller Gruppen mithilfe nicht natürlich vorkommender Aminosäuren

Viele nicht in der Natur vorkommende Aminosäuren weisen andere funktionelle Gruppen auf, die für ein Protein-Engineering von Nutzen sind. So wird beispielsweise durch Bindung eines *p*-Benzoyl-L-Phenylalanins (*p*Bpa) an eine Position von Glutathion-S-Transferase (GST) eine quervernetzende Gruppe hinzugefügt, die man durch UV-Strahlung aktivieren kann. Bei einer auf diese Weise modifizierten GST erzeugt UV-Bestrahlung ein kovalent gebundenes Homodimer (Abb. 11.6).

Der Einbau einer nicht natürlich vorkommenden Aminosäure während der Proteinsynthese *in vivo* erfordert eine mutierte **Aminoacyl-tRNA-Synthetase**, die eine tRNA mit dieser Aminosäure belädt. Im Labor von Peter G. Schultz am Scripps Research Institute wurde ein *E. coli*-Stamm entwickelt, der *p*Bpa an einem spezifischen Amber-Codon einbaut. Mittels gerichteter Evolution wurde eine Tyrosyl-tRNA-Syn-

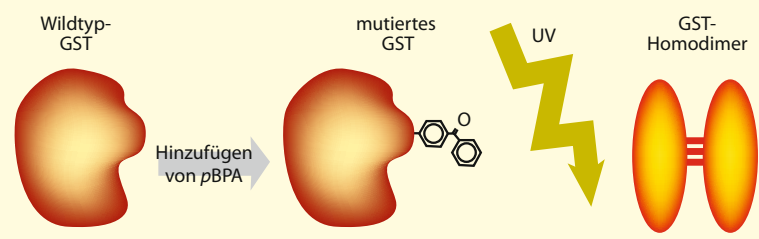
a nicht natürlich vorkommende Aminosäuren



11.6 Hinzufügen neuer funktioneller Gruppen in Proteine

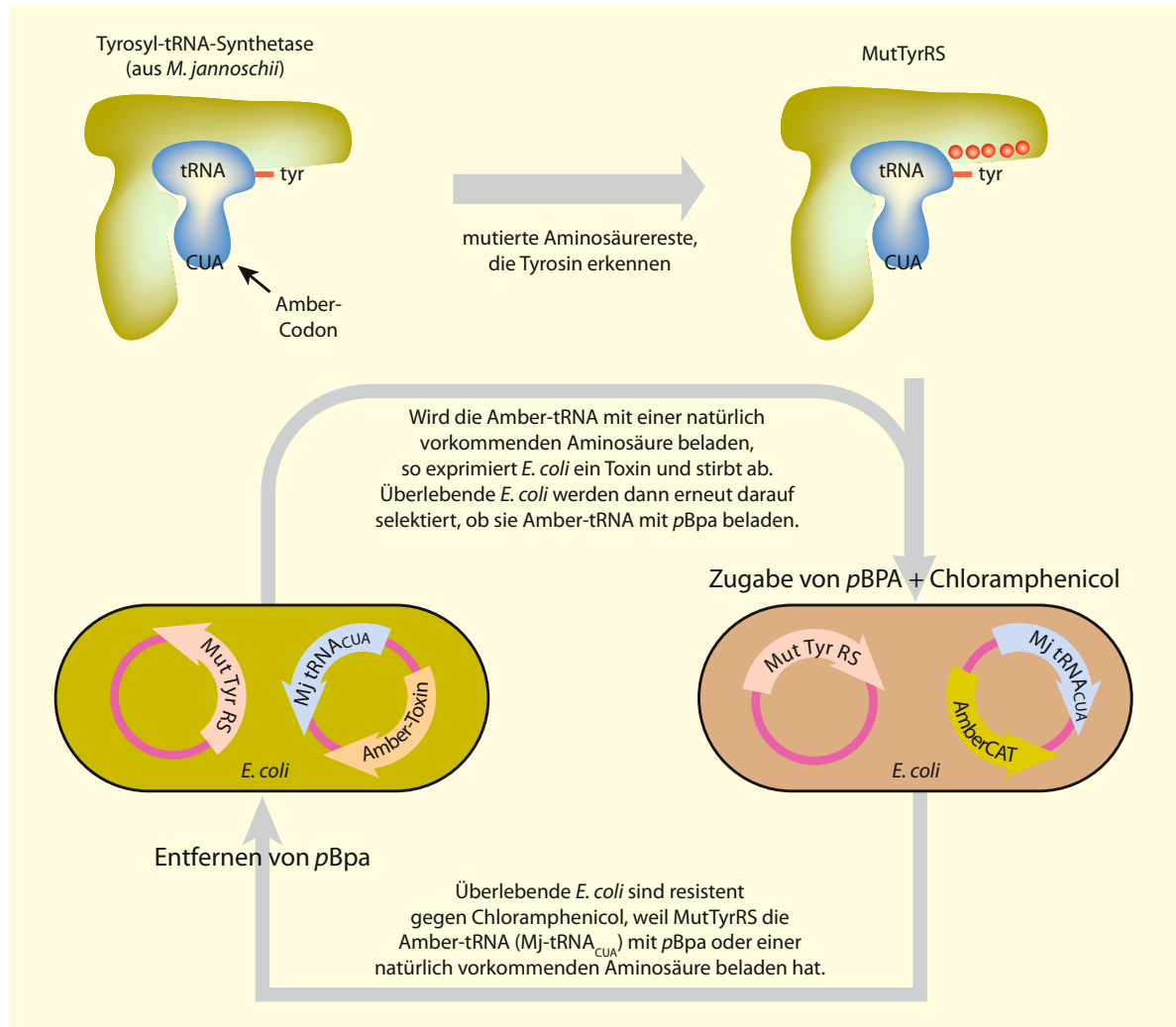
a Nicht in der Natur vorkommende Aminosäuren bringen neue funktionelle Gruppen ein. Sie können während der Translation in ein Protein eingebaut werden. **b** Die nicht natürlich vorkommende Aminosäure *p*Bpa bewirkt eine Quervernetzung des mutierten GST-Proteins zu einem Homodimer.

b *p*BPA fügt GST eine Stelle zur Quervernetzung zu



thetase von *M. jannaschii* mutiert. Das Enzym von *M. jannaschii* wurde verwendet, weil es jede endogene *E. coli*-tRNA erkennt. Folglich muss auch das Gen für seine spezifische Partner-tRNA zur Verfügung

gestellt werden. Die Partner-tRNA wurde zudem so verändert, dass sie anstelle ihres eigentlichen Codons das Amber-Stoppcodon erkennt (d.h. es handelt sich um eine Amber-mutierte tRNA). Die Folge: Wenn



11.7 Positive und negative Selektion auf mutierte tRNA-Synthetase

Tyrosyl-tRNA-Synthetase hängt normalerweise Tyrosin an die tRNA für das CUA-Amber-Codon an. Die Aminosäuren, die Tyrosin erkennen, wurden einer zufallsbedingten Mutagenese unterworfen, um eine Bibliothek aus verschiedenen tRNA-Synthetasen zu erstellen, die nach wie vor dieselbe tRNA erkennen, aber unterschiedliche Aminosäuren anhängen können. Anschließend wurden diese Bibliotheksklone (MutTyrRS) in einer Zelle exprimiert, die ein weiteres Plasmid mit Genen für die Amber-tRNA (Mj-tRNA_{CUA}) und für Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) enthielt. Mitten im CAT-Gen befindet sich ein Amber-Codon (amber-CAT). Diese *E. coli* werden zusammen mit pBpa und Chloramphenicol kultiviert. MutTyrRS muss die Mj-tRNA_{CUA} mit pBpa oder einer anderen Aminosäure beladen, um CAT zu exprimieren, das *E. coli* vor Chloramphenicol schützt. Die Bibliotheksklone, die diese Selektion überleben, werden in einer anderen *E. coli*-Wirtszelle exprimiert (links). Dieser Stamm besitzt das Gen für die Amber-tRNA (Mj-tRNA_{CUA}) plus ein Toxinigen mit einem Amber-Codon. Das Toxinprotein wird synthetisiert, wenn die MutTyrRS die Amber-tRNA mit irgendeiner Aminosäure belädt (in Abwesenheit von pBpa). Dadurch werden Klone eliminiert, welche die Amber-tRNA mit einer endogenen Aminosäure beladen. Um die beste mutierte tRNA-Synthetase zu finden, wendet man abwechselnd die positive und negative Selektionsmethode an.

die mutierte Tyrosyl-tRNA-Synthetase in *E. coli* exprimiert wird, baut sie jede Aminosäure ein, mit der sie an Amber-Stoppcodons beladen wird.

Zur Änderung der Tyrosyl-tRNA-Synthetase wurde durch zufällige Mutation jedes Aminosäurerestes, der an der Erkennung des Aminosäuresubstrats beteiligt ist (ursprünglich Tyrosin), eine Bibliothek aus mutierten Enzymen erstellt. Die Bibliothek aus mutierten tRNA-Synthetase-Genen wurde in *E. coli* transformiert, das ein Gen für die Partner-tRNA besitzt sowie ein Gen für Chloramphenicolresistenz mit einem Amber-Codon in der Mitte. Das Wachstum der Bakterien erfolgte in Anwesenheit von pBpa und Chloramphenicol. War die mutierte tRNA-Synthetase am Amber-Stoppodon in der Lage eine Aminosäure einzubauen, wurde das Chloramphenicolresistenzgen (CAT) exprimiert, und die Zellen lebten. Im anderen Fall starben die Zellen ab. Dies war die positive Selektion (Abb. 11.7).

Mithilfe dieser veränderten tRNA-Synthetase kann man die nicht natürlich vorkommende Aminosäure pBpa in andere Proteine integrieren, wie die zuvor beschriebene GST-Mutante. Somit ist es möglich, an jeder Stelle eines beliebigen Zielproteins quervernetzende Agenzien einzubauen. Dazu muss man in das Gen, welches das interessierende Protein codiert, ein Amber-Codon einfügen und das mutierte Gen in einer *E. coli*-Wirtszelle exprimieren, welche wiederum die veränderte tRNA-Synthetase exprimiert.

Zum Einbau nicht natürlich vorkommender Aminosäuren in Proteine wurden verschiedene Methoden entwickelt. Bei der raffiniertesten Methode werden die codierenden Eigenschaften ausgewählter Codons geändert.

Neukombination von Domänen

Mit der gerichteten Evolution verwandt ist der Ansatz der absichtlichen Rekombination funktioneller Domänen verschiedener Proteine. Als Beispiel kann die Erzeugung eines neuen Restriktionsenzym durch Verknüpfen der Spaltungsdomäne des Restriktionsenzym *FokI* mit anderen sequenzspezifischen DNA-bindenden Domänen dienen. Bei *FokI* handelt es sich um ein **Typ-II-Restriktionsenzym** mit charakteristischen N-terminalen und C-terminalen Domänen, die zur DNA-Erkennung beziehungsweise zur Spaltung von DNA dienen. Für sich alleine schneidet die Endonucleasedomäne DNA unspezifisch. Ist die Nucleasedomäne jedoch an eine DNA-bindende Domäne gekoppelt, bestimmt diese Domäne die Sequenzspezifität des Hybridproteins. Die beiden Domänen können über eine Sequenz verbunden sein, die für ein Linkerpeptid wie (GlyGlyGlyGlySer)₃ codiert (Abb. 11.8).

Exkurs 11.1

Glyko-Engineering

Bei vielen Proteinen, insbesondere von höheren Tieren, sind an die Polypeptidkette noch zusätzlich Zuckerreste mit ganz entscheidender Funktion für die Proteinaktivität angehängt. Werden solche Glykoproteine mit gentechnischen Methoden hergestellt, so müssen sie richtig modifiziert werden, wie in Kapitel 10 erläutert. Aber genau wie eine Veränderung der Aminosäuresequenz Proteinen neue Eigenschaften verleihen kann, kann ein verändertes Glykosylierungsmuster eines Glykoproteins zu nützlichen Änderungen im Proteinverhalten führen.

Ein häufig verwendetes, gentechnisch hergestelltes Glykoprotein ist rekombinantes menschliches Erythropoetin, das von der Firma Amgen Corporation unter dem Namen Epogen vermarktet wird. Erythropoetin regt die Produktion roter Blutkörperchen (Erythrocyten) an. Es wird zur Behandlung von Anämien eingesetzt und bewirkt, dass weniger Bluttransfusionen nötig sind.

An natürliches Erythropoetin sind vier Oligosaccharide gebunden. Als man Erythropoetin so manipulierte, dass es zusätzliche N-gekoppelte Glykosylierungsstellen (Asn-Xxx-Ser/Thr) aufwies, änderte sich seine Aktivität auf paradoxe Weise. Trotz verminderter Affinität zu seinen Rezeptor stieg seine Aktivität *in vivo* an. Dies war auf die längere Halbwertszeit nach der Verabreichung zurückzuführen. In der praktischen Anwendung wog die längere Halbwertszeit die verringerte Rezeptoraffinität auf – das resultierende Protein zeigte eine signifikant erhöhte klinische Wirkung. Diese nochmals veränderte Variante ist unter dem Namen Aranesp im Handel. Es scheint wahrscheinlich, dass sich ein ähnliches Glyko-Engineering auch auf andere Glykoproteinhormone anwenden lässt.

Die Spaltung der DNA erfolgt mehrere Basen neben der Erkennungssequenz – wie bei dem natürlich vorkommenden *FokI*-Restriktionsenzym.

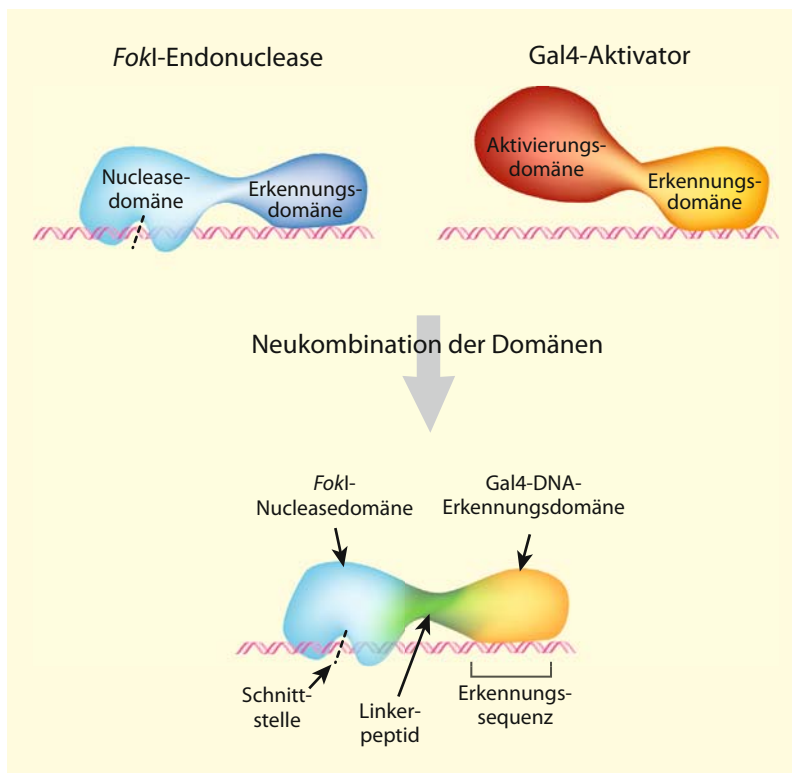
Man hat mehrere verschiedene DNA-bindende Domänen mit der Nucleasedomäne von *FokI* verbunden. Das **Gal4-Protein** der Hefe ist beispielsweise ein Transkriptionsaktivator, der eine 17 Basenpaare umfassende Consensussequenz erkennt. Gal4 enthält zwei Domänen, eine DNA-bindende Domäne und eine Transkriptions-aktivierende Domäne. Die N-terminalen 147 Aminosäuren von Gal4 kann man mit der Nucleasedomäne von *FokI* verknüpfen und erhält dadurch ein Hybridprotein, das an die Gal4-Consensussequenz bindet und die DNA an dieser Stelle spaltet.

Zinkfingerdomänen wurden ebenfalls mit der Nucleasedomäne von *FokI* verknüpft. Beim Zinkfinger handelt es sich um ein verbreitetes DNA-Bindungsmotiv, das sich in zahlreichen regulatorischen Proteinen findet. Der Zinkfinger besteht aus 25 bis 30 Aminosäuren, die um ein Zn-Ion angeordnet sind; dieses wird durch Bindung an konservierte Cystein- und Histidinreste an seinem Platz fixiert. Jedes Zinkfingermotiv bindet drei Basenpaare, und eine Zinkfingerdomäne kann mehrere Motive aufweisen.

In diesem Beispiel wurden Domänen von etwa 90 Aminosäuren Länge, die drei Zinkfinger motive enthalten (und daher spezifisch DNA-Sequenzen aus neun Basen erkennen), mit der *FokI*-Nucleasedomäne verknüpft (Abb. 11.9).

Mittlerweile sind sowohl die Aminosäuresequenz als auch die entsprechende DNA-Erkennungspezifität für eine ganze Reihe von Zinkfingern bekannt. Anhand dieser Informationen kann man Zinkfingerdomänen so konstruieren, dass sie jede gewünschte DNA-Sequenz ablesen können. DNA-Abschnitte, die für Zinkfingerdomänen codieren, können entweder von natürlich vorkommenden DNA-bindenden Proteinen stammen oder künstlich synthetisiert werden, da einzelne Zinkfinger motive ungefähr 25 Aminosäuren (75 Nucleotide) lang sind. Im Prinzip kann man heute gentechnisch hergestellte Proteine mit einer Zinkfingerdomäne ausstatten, mit der sie spezifisch an jede gewünschte DNA-Sequenz binden können.

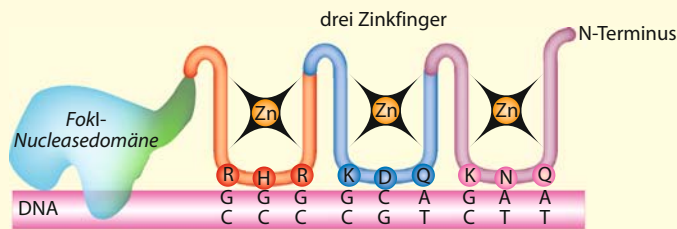
Viele Proteine bestehen aus Domänen mit individueller Funktion. Durch Neukombination von Domänen verschiedener Proteine kann man Proteine mit neuen Eigenschaftskombinationen erzeugen.



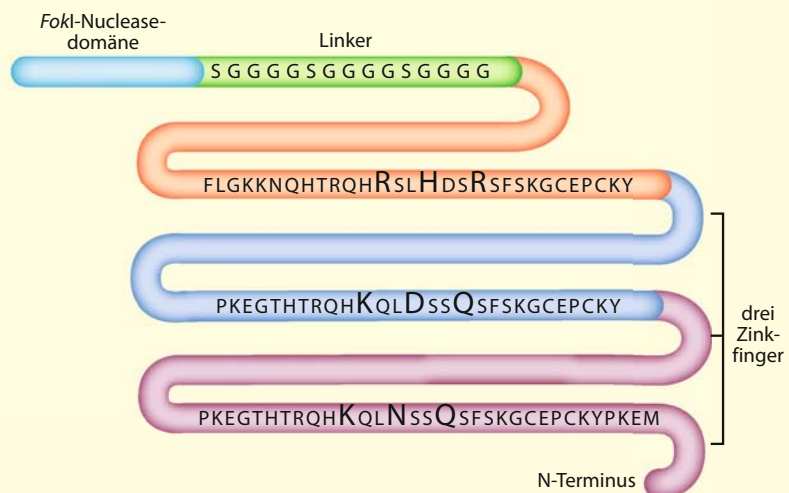
11.8 Erzeugung neuer Endonucleasen durch Neukombination von Domänen

Die *FokI*-Endonuclease enthält separate Nuclease- und Sequenz-erkennungsdomänen. Man kann die Erkennungsdomäne von *FokI* gentechnisch durch eine Gal4-Erkennungsdomäne ersetzen, die an eine andere DNA-Sequenz bindet. Verknüpft werden die beiden Domänen mit einem künstlichen Linkerpeptid. Das neu entstandene Hybridenzym schneidet DNA nun an anderen Stellen als das ursprüngliche *FokI*-Protein.

a FokI-Zinkfinger-Hybridprotein



b Sequenz der Zinkfinger



11.9 Zusammenbau der Zinkfingerdomänen

a Die Nucleasedomäne von FokI kann mit einer Zinkfingerdomäne verknüpft werden, die drei Zinkfinger motive enthält. Zinkfinger erkennen jeweils drei Nucleotide. Daher kann prinzipiell jede neun Basenpaare lange Erkennungssequenz mit der Nucleasedomäne verbunden werden. **b** Die Sequenz des Hybrids der FokI-Nuclease und der Zinkfingerdomäne. Die Buchstaben stehen für die Aminosäuresequenz. In großen Buchstaben hervorgehobene Aminosäuren erkennen und binden die DNA-Sequenz.

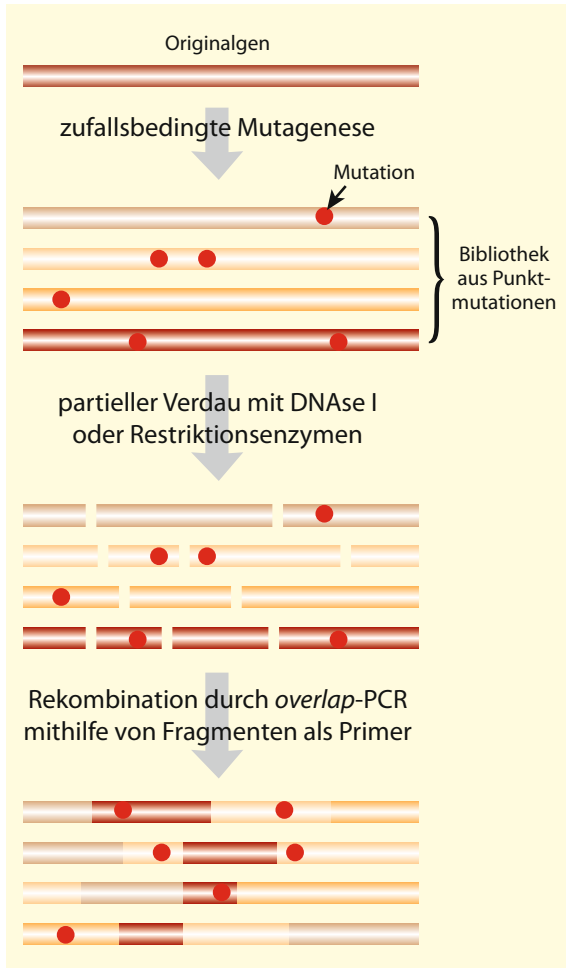
DNA-Shuffling

Auf neue Sequenzen, die durch Mutation und Rekombination entstehen, wirkt die natürliche Selektion ein. Eine Methode der künstlichen Evolution ist das sogenannte **DNA-Shuffling**; hierbei werden sowohl neue Mutationen als auch Rekombinationen erzeugt. Zunächst wird das Gen, das verbessert werden soll, nach dem Zufallsprinzip in Abschnitte von rund 100 bis 300 Basenpaaren Länge geschnitten. Diese Abschnitte werden dann mithilfe einer geeigneten DNA-Polymerase mit überlappenden Abschnitten neu angeordnet bzw. durch eine Version der *overlap*-PCR (s. Kap. 4). Hierbei erfolgt eine Rekombination von Abschnitten verschiedener Kopien desselben Gens (Abb. 11.10).

Mutationen können auf verschiedene Weise ausgelöst werden, unter anderem durch die bereits be-

schriebenen Standardmethoden der Mutagenese. Zusätzlich können die DNA-Abschnitte mittels *error prone*-PCR (s. weiter vorne) anstelle von Restriktionsenzymen erzeugt werden. Alternativ kann man die Mutationen auch während der Neuzusammensetzung selbst einführen, und zwar mithilfe einer DNA-Polymerase mit beeinträchtigter Korrekturlesefunktion. Dies führt zu einer großen Zahl von Kopien des Gens, die jeweils mehrere, nach dem Zufallsprinzip über ihre Sequenz verstreute Mutationen aufweisen. Die letztendlich vermischten und mutierten Genkopien müssen dann exprimiert und auf veränderte Eigenschaften des codierten Proteins überprüft werden.

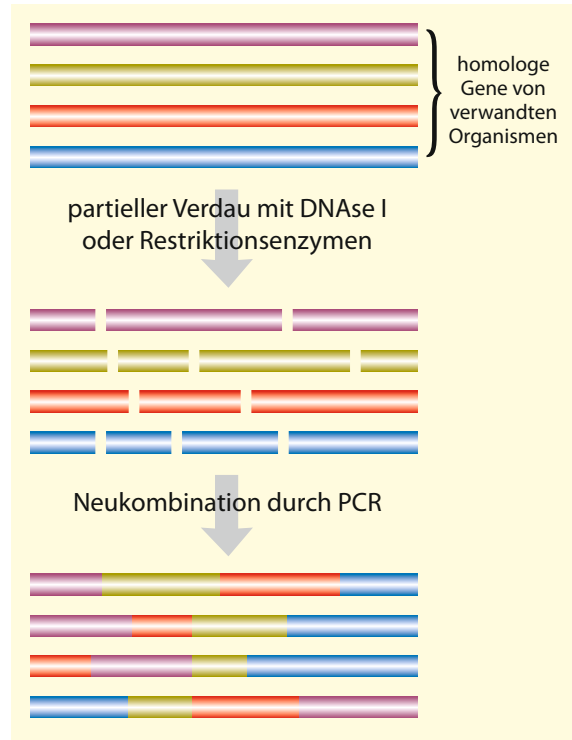
Für eine effektivere Variante des DNA-Shuffling dienen als Ausgangsmaterial mehrere nah verwandte (also homologe) Versionen des gleichen Gens aus verschiedenen Organismen. Diese Gene werden mit geeigneten Restriktionsenzymen nach dem Zufalls-



11.10 DNA-Shuffling für ein einzelnes Gen

Durch Einführen von Punktmutationen und Shuffling (Neukombination) der Genabschnitte lassen sich verbesserte Versionen eines Proteins herstellen. Zunächst werden zahlreiche Kopien des Originalgens mit zufälligen Mutationen erzeugt. Diese Gene werden anschließend nach dem Zufallsprinzip in einzelne Abschnitte zerschnitten. Zum Schluss werden diese Abschnitte dann mittels *overlap*-PCR wieder zusammengesetzt. Die neuen Konstrukte müssen schließlich noch auf eine verbesserte Proteinfunktion überprüft werden.

prinzip geschnitten und die Abschnitte vor der Neuzusammensetzung vermischt. Als Ergebnis erhält man ein Gemisch aus Genen, bei denen verschiedene Abschnitte aus unterschiedlichen Ausgangsgenen neu kombiniert sind (Abb. 11.11). Man beachte, dass die neu zusammengesetzten Abschnitte ihre ursprüngliche natürliche Reihenfolge beibehalten. Auf diese



11.11 DNA-Shuffling für mehrere verwandte Gene

Die Neukombination von Abschnitten verwandter Gene kann die Funktion eines Proteins ebenfalls verbessern. Zunächst werden verwandte Ausgangsgene in kleine Abschnitte verdaut und dann mittels PCR wieder zusammengefügt. Anschließend überprüft man die Neukombinationen auf eine Funktionsänderung.

Weise hat man beispielsweise mehrere verwandte β -Lactamasen aus verschiedenen Darmbakterien vermischt. Die gemischten Gene wurden in einen Plasmidvektor kloniert und in Wirtsbakterien transformiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Resistenz gegen ausgewählte β -Lactam-Antibiotika überprüft. Mit dieser Methode erhielt man verbesserte β -Lactamasen, die bestimmte Penicilline und Cephalosporine schneller abbauten und ihre Wirtszellen bis zu 500-mal widerstandsfähiger gegen β -Lactam-Antibiotika machten.

Beim DNA-Shuffling wird die codierende Sequenz eines Proteins neu angeordnet. Man hofft, dadurch neue oder bessere Wirkungen zu erzeugen. Um eine größere Variation zu erhalten, können bei diesem Vorgang auch Mutationen erzeugt werden.

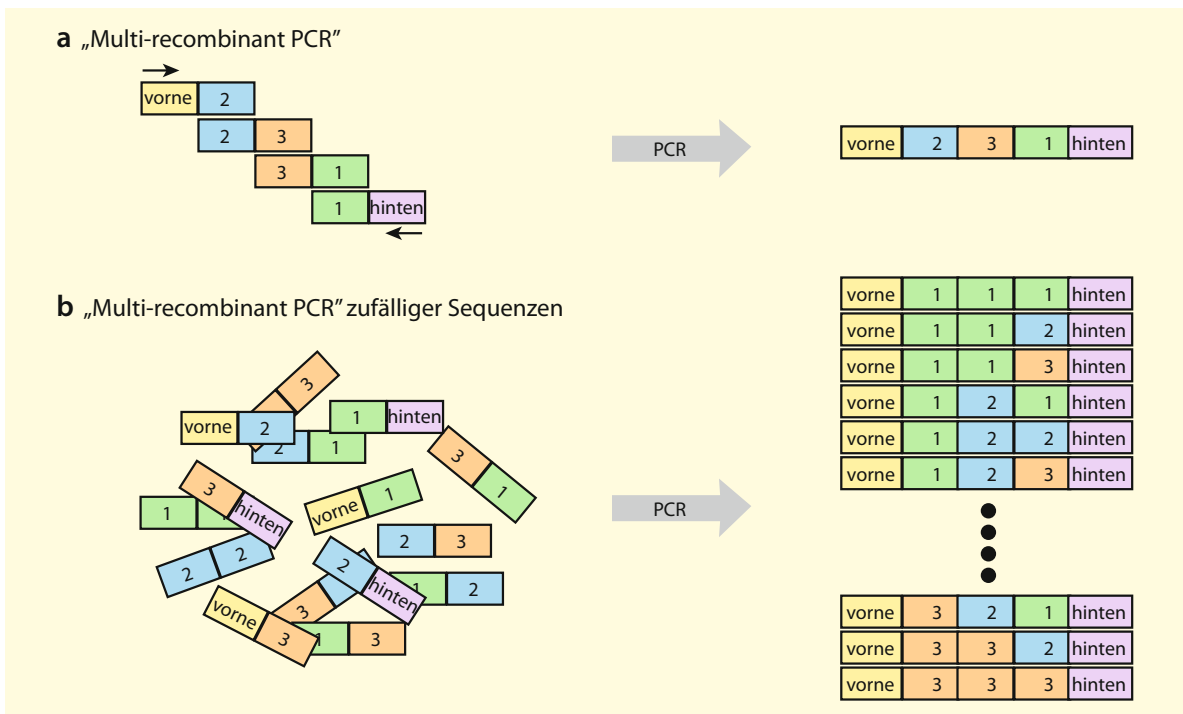
Kombinatorische Proteinbibliotheken

Bislang wurden Wege erläutert, wie man ein bereits existierendes nützliches Protein modifizieren kann. Beim Protein-Engineering wird aber auch noch ein anderer Ansatz verfolgt, nämlich eine große Zahl unterschiedlicher Proteinsequenzen zu erzeugen und diese dann auf eine nutzbare Enzymwirkung oder chemische Eigenschaft zu überprüfen. (Dieses Screening erfolgt häufig mittels Phagen-Display oder ähnlicher in Kapitel 9 beschriebener Techniken.) Beim sogenannten **kombinatorischen Screening** werden jedoch nicht einfach nur nach dem Zufallsprinzip große Mengen von Polypeptiden erzeugt; vielmehr geht man von bestimmten vorgefertigten Modulen aus und stellt daraus eine sogenannte **random shuffling library** („Bibliothek aus zufällig angeordneten Sequenzabschnitten“) zusammen. Auf diese Weise kann man beispielsweise Proteinmotive, die nach-

weislich eine Bindungsstelle für Metallionen oder Metaboliten enthalten, mit Abschnitten kombinieren, die bestimmte Strukturen wie eine α -Helix bilden.

Bei einer häufig angewendeten Methode stellt man zunächst durch chemische DNA-Synthese DNA-Module aus rund 75 Basenpaaren (also 25 Codons) her. Danach fügt man mehrere solcher Module zu neuen künstlichen Genen zusammen. Die Verknüpfung der Module erfolgt normalerweise mittels PCR mit überlappenden Primern (s. Kap. 4). Man kann die Module in einer festgelegten Reihenfolge oder nach dem Zufallsprinzip aneinanderfügen. Damit die zusammengesetzte Sequenz auch richtig exprimiert wird, achtet man gewöhnlich darauf, dass die Module am Anfang und am Ende geeignete Promotor- beziehungsweise Terminatorsequenzen enthalten. Die dazwischen liegenden Module können dann nach dem Zufallsprinzip vermischt werden, um potenziell mehr Variationen zu erhalten (Abb. 11.12).

Die daraus entstehende Proteinbibliothek kann man dann auf Aktivitäten überprüfen, die auf die



11.12 Erstellen einer *random shuffling library*

Zum Erstellen einer Bibliothek aus neuen Proteinen kann man verschiedene Module nach dem Zufallsprinzip aneinanderfügen. Das erste Modul (gelb) enthält eine Sequenz für den Promotor und wird deshalb stets am Anfang eingefügt. Ähnlich umfasst das letzte Modul (violett) die Terminatorsequenzen. Mithilfe von überlappenden PCR-Primern kann man die Module in einer bestimmten Reihenfolge aneinanderfügen (**a**) oder nach dem Zufallsprinzip (**b**). Bei der zufälligen Aneinanderreihung erhält man viele unterschiedliche Kombinationen. Daher entsteht durch diese Methode eine Bibliothek aus neuen Proteinen, die man anschließend auf eine bestimmte Funktion oder eine Kombination von Funktionen testen kann.

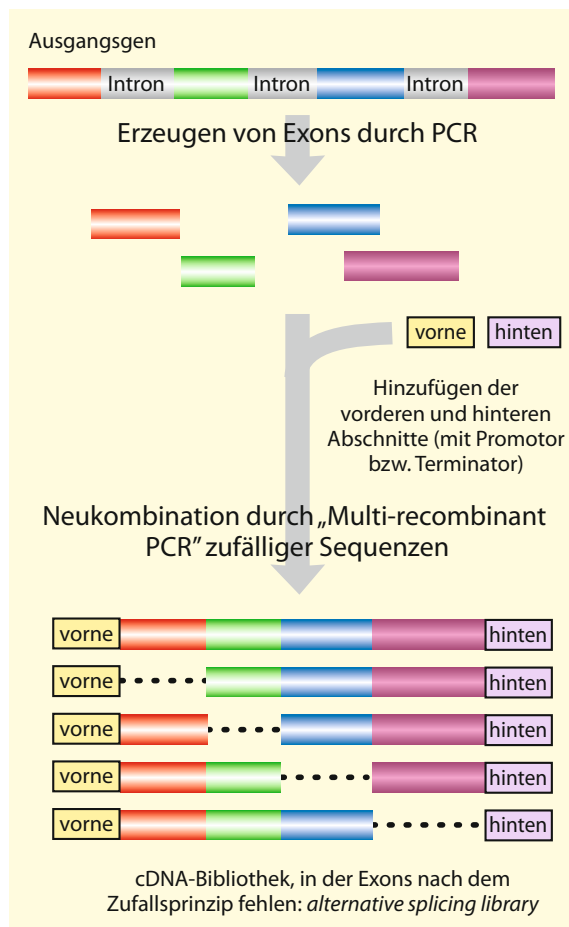
verwendeten Module zurückzuführen sind. Waren beispielsweise Module für die Bindung eines organischen Metaboliten und für die Bindung von Fe-Ionen enthalten, dann kann man die Bibliothek der Produkte auf eine Enzymaktivität testen, bei der dieser Metabolit mittels einer Eisen-vermittelten Katalyse oxidiert wird.

Eine verwandte Methode beruht auf der Vorstellung, dass die Exons eukaryotischer Gene modulare Abschnitte von Proteinen codieren, wie z.B. Bindungsstellen und Strukturmotive. Zwar trifft es keineswegs immer zu, aber in vielen Fällen entsprechen die Grenzen der Exons den Enden von Strukturdomänen innerhalb der codierten Proteine. Folglich geht man davon aus, dass sich zumindest einige

eukaryotische Gene durch natürliches Shuffling von Exons entwickelt haben.

Durch das Shuffling von Exons ergibt sich eine **kombinatorische Bibliothek** aus bereits existierenden eukaryotischen Genen. Jedes der Exons des eukaryotischen Gens wird mittels einer separaten PCR erzeugt. Anschließend werden die Abschnitte vermischt und mittels *overlap*-PCR neu aneinandergefügt. Je nach Aufbau der überlappenden Primer für die PCR gibt es zwei Varianten. Durch Aneinanderreihen der Exons in einer zufälligen Reihenfolge erhält man eine *random splicing library* („Bibliothek aus zufällig gespleißten Sequenzabschnitten“), ganz ähnlich wie zuvor beschrieben. Bei der weniger radikalen *alternative splicing library* („Bibliothek aus alternativ gespleißten Sequenzabschnitten“) bleibt die Reihenfolge der Exons erhalten – bestimmte Exons werden jedoch jeweils nach dem Zufallsprinzip aufgenommen oder ausgeschlossen (Abb. 11.13). Die Endprodukte werden dann zunächst daraufhin analysiert, ob sie Sequenzen enthalten, die lang genug sind, um einen Großteil der ursprünglichen Exons zu codieren. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit für ein funktionsfähiges Protein deutlich.

Bei einer weiteren Shuffling-Technik werden neue Proteine aus vorgefertigten Proteinmodulen erzeugt. Die codierenden Sequenzen für die Module werden mittels PCR in verschiedenen Kombinationen aneinandergefügt.



11.13 Erstellen einer *alternative splicing library*

Die Exons eines Ausgangsgens können so neu kombiniert werden, dass in jedem neuen Konstrukt jeweils ein einziges Exon fehlt. Die neu entstandenen Gene werden dann auf neue oder veränderte Funktionen überprüft.

Die Herstellung von Biomaterialien beruht auf Protein-Engineering

In der Medizin kommt den Biomaterialien eine große Bedeutung zu, beispielsweise in der rekonstruktiven Chirurgie, bei der Gewebezüchtung oder Gewebe-Engineering (engl. *tissue engineering*) und in der regenerativen Medizin. Zu solchen Biomaterialien zählen beispielsweise Gefäßprothesen und Gerüste aus Knorpelgewebe, die als stabilisierende Unterlage das Wachstum neuen Gewebes ermöglichen. Die für diese Produkte verwendeten Materialien bestehen aus Proteinen und können daher durch den Einsatz von Protein-Engineering sowohl mechanisch als auch biochemisch verbessert werden.

Viele Biomaterialien beruhen auf Proteinen der extrazellulären Matrix, die auch *in vivo* eine stabilisie-

rende Stützfunktion haben. In Knorpel sind zum Beispiel die Proteine Kollagen und Elastin enthalten. *In vivo* werden diese von bestimmten, als Chondrocyten (Knorpelzellen) bezeichneten Zellen sezerniert und bilden ein hartes, elastisches Stützmaterial zur Abpolsterung der Gelenke. Die **Elastin-ähnlichen Polypeptide (ELPs)** (engl. *elastin-like polypeptides*) sind gentechnisch hergestellte Proteine, die dem natürlich vorkommenden Elastin gleichen. ELPs enthalten sich wiederholende Peptidsequenzen wie (VPGZG)_x, wobei Z jede Aminosäure mit Ausnahme von Prolin sein kann. Bei Veränderung dieser sich wiederholenden Sequenz ändern sich auch die physikalischen Eigenschaften des entstehenden Materials. Beim Einbau von Lysinresten kann zwischen zwei ELP-Strängen eine Quervernetzung erfolgen. Durch Variation der Position und Anzahl der Lysine können verschiedene Formen von Filmen entstehen. Alternativ können in ELP-Peptide auch UV-empfindliche quervernetzende Gruppen eingebaut werden. Dann verbleiben die Peptide so lange als lösliche Stränge, bis sie UV-Licht ausgesetzt sind. Durch diese Möglichkeit der Regulation einer Gelbildung kann ein Arzt die flüssige Form an der gewünschten Stelle injizieren und die ELPs anschließend zu einem Gel quervernetzen.

Diese Materialien können aber nicht nur Stützfunktionen erfüllen, sondern auch die Heilung und Regeneration von Geweben fördern, indem sie Zellen in diesen Bereich locken. Die Kopplung verschiedener Protein-bindender Domänen an die sich wiederholenden Peptide kann eine Zellwanderung und -adhäsion begünstigen. So erkennt beispielsweise der Membranrezeptor Integrin das Protein Fibronectin in der extrazellulären Matrix. Wird die Integrin-bindende Domäne von Fibronectin mit einem ELP-repeat abgewechselt, dann werden dies die Integrin-exprimierenden Zellen erkennen und in die ELP-Substanz einwandern. Ein weiteres Beispiel ist das Peptid Val-Ala-Pro-Gly, das von einem membrangebundenen Rezeptor der glatten Muskelzellen von Blutgefäßen erkannt wird. Wird dieses Peptid alternierend mit der ELP-Sequenz aneinandergereiht, ergibt sich ein Material, das ausschließlich Bewegung und Wachstum der glatten Muskelzellen der Gefäße fördert. Zellwanderung und -wachstum lassen sich auch noch auf eine andere Weise auslösen, durch den Einbau von verschiedenen Wachstumsfaktoren in die ELPs. Mischt man beispielsweise die Wachstumsfaktoren VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) oder PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) mit ELPs, induziert dies die Bildung von Blutgefäßen innerhalb der Matrix.

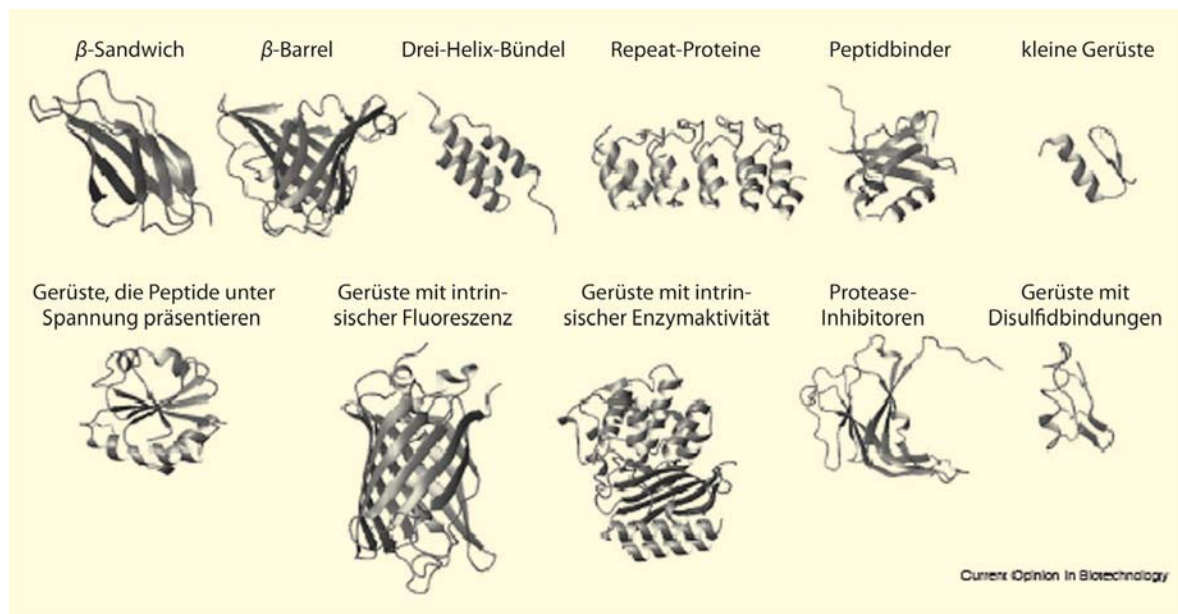
In der Medizin eingesetzte Biomaterialien, insbesondere extrazelluläre Proteine, wie sie in der rekonstruktiven Chirurgie Verwendung finden, können durch Protein-Engineering optimiert werden.

Gentechnisch hergestellte Bindungsproteine

Wenn Arzneimittel nur auf ein bestimmtes Organ einwirken, lassen sich dadurch viele unerwünschte Nebenwirkungen ausschalten. Erreichen lässt sich dies zum Beispiel, indem man an das Arzneimittel ein Reagens koppelt, das für bestimmte Gewebe spezifische Proteine erkennt. Wie in Kapitel 6 angemerkt, werden zur Bindung spezifischer Zielproteine am häufigsten Antikörper eingesetzt. Damit Antikörper funktionieren, sind jedoch Quervernetzungen durch Disulfidbindungen erforderlich, die bei der Herstellung in großem Maßstab kaum aufrechtzuhalten sind. Daher haben einige Wissenschaftler nach Alternativen für Antikörper gesucht.

Die Suche nach alternativen Bindungspartnern, die keine Antikörper sind, hat sich vielfach auf bestimmte Strukturdomänen von Proteinen konzentriert. Da schon viele verschiedene Proteine kristallisiert wurden und ihre Struktur bekannt ist, kann man entsprechend viele verschiedene Bindungsdomänen vergleichen. Die Bindungsdomänen einer Proteinfamilie weisen die gleiche Grundstruktur auf wie β -Barrel oder Drei-Helix-Bündel (Abb. 11.14). Um neue Bindungsdomänen zu erzeugen, wählt man ein Bindungsprotein mit bekannter Struktur aus und stellt fest, welche Aminosäurereste mit der Bindung in Zusammenhang stehen. Dann modifiziert man dieses Bindungsprotein durch Mutation dieser Reste und führt einen Test auf neue Bindungspartner durch. Man hofft, durch diese zielgerichtete Evolution neue, leichter isolierbare Proteine zu finden, durch die sich Arzneimittel gezielt auf bestimmte Zielzellen des menschlichen Körpers ausrichten lassen.

Die Konstruktion von Bindungsproteinen für verschiedene Zwecke befindet sich noch in der Versuchsphase. Eines Tages könnte es jedoch möglich sein, die unhandlichen Antikörper durch kleinere, stabilere Proteine zu ersetzen.



11.14 An der Protein-Protein-Bindung beteiligte Strukturdomänen

Verschiedene Formen von Proteingerüsten, die als Gerüststruktur für Protein-bindende Agenzien verwendet werden. Die verwendeten Proteine sind (mit Angabe der ID-Nummer der Protein Data Bank): β -Sandwich (1FNA, Fibronectin); β -Barrel (A-Kette von 1BBP, Lipocalin); Drei-Helix-Bündel (1Q2N, SpA-Domäne); Repeat-Proteine (1MJ0, AR-Protein); Peptidbinder (Kette A von 1KWA, PDZ-Domäne); kleine Gerüste (Kette F von 1MEY, Zinkfingerprotein); Gerüste, die Peptide unter Spannung präsentieren (Kette A von 2TrX, Thioredoxin A); Proteingerüste mit intrinsischer Fluoreszenz (Kette A von 1GFL, GFP) oder intrinsischer Enzymaktivität (1M40, β -Lactamase); Protease-Inhibitoren (1ECY, Ecotin); und Gerüste mit Disulfidbindungen (Kette A von 1CMR, Skorpiongift). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung aus: Binz und Plückthun (2005) Engineered proteins as specific binding reagents. *Curr Opin Biotechnol* 16: 459–469.

► Weiterführende Literatur

- Baltz RH (2006) Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nat Biotechnol* 24: 1533–1540
- Binz HK, Plückthun A (2005) Engineered proteins as specific binding reagents. *Curr Opin Biotechnol* 16: 459–469
- Bloom JD, Meyer MM, Meinhold P, Otey CR, MacMillan D, Arnold FH (2005) Evolving strategies for enzyme engineering. *Curr Opin Struct Biol* 15: 447–452
- Branden C, Tooze J (1998) *Introduction to Protein Structure*. 2. Aufl. Garland Publishing, New York
- Chaparro-Riggers JF, Polizzi KM, Bommarius AS (2007) Better library design: Data-driven protein engineering. *Biotechnol J* 2: 180–191
- Chin JW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG (2002) Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11020–11024
- Hohsaka T, Sisido M (2002) Incorporation of non-natural amino acids into proteins. *Curr Opin Chem Biol* 6: 809–815
- Kaur J, Sharma R (2006) Directed Evolution: An approach to engineer enzymes. *Crit Rev Biotechnol* 26: 165–199
- Kittendorf JD, Sherman DH (2006) Developing tools for engineering hybrid polyketide synthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* 17: 597–605
- Leisola M, Turunen O (2007) Protein engineering: Opportunities and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 1225–1232
- Lesk AM (2004) *Introduction to Protein Science: Architecture, Function, and Genomics*. Oxford University Press, New York
- Maskarinec SA, Tirrell DA (2005) Protein engineering approaches to biomaterials design. *Curr Opin Biotechnol* 16: 422–426
- Qian Z, Fields CJ, Yu Y, Lutz S (2007) Recent progress in engineering alpha/beta hydrolase-fold family members. *Biotechnol J* 2: 192–300
- Wang L, Brock A, Herberich B, Schultz PG (2001) Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* 292: 498–500
- Woycechowsky KJ, Vamvaca K, Hilvert D (2007) Novel enzymes through design and evolution. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 75: 241–294

Umwelt- biotechnologie

Einführung

Identifizieren neuer Gene mittels Metagenomik

Anreicherung der Kulturen für Umweltproben

Sequenzabhängige Techniken in der Metagenomik

Auf Funktion oder Aktivität beruhende Umweltanalysen

Ökologie und Metagenomik

Natürliche Attenuation von Schadstoffen

Weiterführende Literatur

Einführung

Unsere Umwelt diene stets als Quelle neuer Produkte und als Inspiration zur Entwicklung neuer Technologien. Die menschliche Spezies weiß die Umwelt sehr erfolgreich für sich zu nutzen. Ebenso gut ist sie aber auch darin, die Umwelt für kurzfristige Profite zu zerstören oder zu schädigen. Unsere sichtbare Umwelt ist katalogisiert und kartiert, Gebiete in der Tiefsee oder im unzugänglichsten Dschungel sind jedoch nach wie vor weitgehend unbekannt. Selbst viele Teile der sichtbaren Umwelt beherbergen noch unbekannte Lebensformen, die mit bloßem Auge nicht sichtbar sind, wie Bakterien und Viren. Diese leben in der Luft, im Wasser und an Land. Viele von ihnen zeichnen sich durch einen einzigartigen Stoffwechsel aus und manche durch zuvor nicht gekannte Fähigkeiten. Zahlreiche Organismen können in extremen Umgebungen leben, die man einst als zu heiß oder zu trocken für die Existenz von Leben erachtete.

Schätzungen zufolge gibt es in der Biosphäre ungefähr 10^{31} bis 10^{32} Viruspartikel und damit eine Zehnerpotenz mehr als Wirtszellen. Die „**Virosphäre**“ (im Englischen spricht man bisweilen von *virosphere*) stellt wahrscheinlich die größte Quelle für neue Gene dar. Zu dem Zeitpunkt, als dieses Buch geschrieben wurde, hatte man erst zwischen 0,1 und 1 % der Mikroorganismen in Kultur gezüchtet. Selbst die Mehrzahl jener, die bei moderaten Temperaturen im Boden oder anderen gewöhnlichen Lebensräumen vorkommen, wurde nicht kultiviert. Neben der DNA in Lebensformen findet sich in der Umwelt auch noch jede Menge freie DNA, die ebenfalls als Quelle für neue Gene dienen könnte. Das Gebiet der Umweltbiotechnologie hat die Erforschung dieser zuvor verborgenen Lebensformen und DNA revolutioniert. Welche Geheimnisse bergen sie? Welche neuen Enzyme und Proteine wird man finden?

Heute werden molekularbiologische Techniken direkt auf die Umwelt angewendet, um Viren und Bakterien zu erforschen, die nicht in Kultur gezüchtet werden. In der Hoffnung, neue Gene zu finden, werden routinemäßig mittels PCR zufällige Sequenzen aus zahlreichen Umweltproben amplifiziert. Im Anschluss an die PCR wird die DNA sequenziert (zu PCR und Sequenzierung s. Kap. 4). Mithilfe computergestützter Techniken wird dann ermittelt, ob diese (oder eine nahe verwandte) Sequenz bereits identifiziert ist oder ob es sich um eine völlig neue handelt (s. Kap. 8). Des Weiteren werden Microarrays

erstellt, um die Zahl und Typen der in verschiedenen Umwelten vorkommenden Mikroorganismen zu vergleichen (s. Kap. 8). Fast jede der in der ersten Hälfte dieses Buches erwähnten Methoden mit rekombinanter DNA kann auf Proben aus der Umwelt angewandt werden.

Die Umweltbiotechnologie lässt sich in verschiedene Teilgebiete unterteilen. Dazu gehören die direkte Erforschung der Umwelt, Forschungen mit Fokus auf angewandte Techniken oder Forschungen, bei denen man Informationen aus der Umwelt auf anderen Gebieten anwendet. Dieses Kapitel befasst sich mit direkten Analysen der Umwelt und mit den natürlichen biochemischen Prozessen. In späteren Kapiteln werden auch Forschungen über angewandte Techniken oder Ergebnisse aus der Umweltforschung mit praktischer Anwendungsmöglichkeit behandelt. Bei der Untersuchung verschiedener Umwelten könnten neue Lebensformen, neue Stoffwechselwege oder einzelne neue Gene entdeckt werden. Die Techniken der Genomik haben dieses sich rasch ausdehnende Gebiet revolutioniert.

Unsere Umwelt beherbergt zahlreiche unsichtbare Lebensformen wie Viren, Bakterien oder sonstige „genetische Einheiten“ (s. Kap. 4).

Identifizieren neuer Gene mittels Metagenomik

Als **Metagenomik** bezeichnet man die Erforschung des Genoms ganzer Lebensgemeinschaften mikroskopischer Lebensformen. Zu den angewandten genetischen Methoden gehören unter anderem *shotgun*-DNA-Sequenzierung, PCR und RT-PCR. Manchmal können im Rahmen solcher Forschungen Mikroorganismen, Viren oder freie DNA in der natürlichen Umwelt identifiziert werden, indem man Gene oder DNA-Sequenzen dieser Organismen findet. Die Metagenomik baut auf das Wissen auf, dass alle Geschöpfe Nucleinsäuren besitzen, die für verschiedene Proteinprodukte codieren. Daher muss man die Organismen nicht unbedingt kultivieren, sondern kann sie auch anhand einer bestimmten Gensequenz, eines bestimmten Proteins oder Metaboliten erkennen. Die Vorsilbe *Meta-* bedeutend „umfassender“ und wird beispielsweise auch bei der Metaanalyse verwendet, wobei mehrere getrennte Analysen statistisch kombi-

niert werden. Die Herangehensweise in der Metagenomik gleicht der in der Genomik. Der Unterschied zwischen Genomik und Metagenomik liegt in der Natur der Proben.

Bei der Genomik steht ein Organismus im Mittelpunkt, die Metagenomik befasst sich hingegen mit einem Gemisch von DNA mehrerer Organismen, „genetischer Einheiten“ (d.h. Viren, Viroide, Plasmide etc.) und/oder freier DNA. In der Metagenomik erforschen, katalogisieren und analysieren Wissenschaftler die gegenwärtige Vielfalt an Mikroorganismen. Sie entdecken neue Proteine, Enzyme und biochemische Reaktionswege. Zudem hoffen sie, Einblicke in die Eigenschaften und Funktionen der neuen Organismen liefern zu können. Die durch die Metagenomik gesammelten Erkenntnisse haben das Potenzial, unseren Umgang mit der Umwelt zu unserem Nutzen oder Schaden zu beeinflussen.

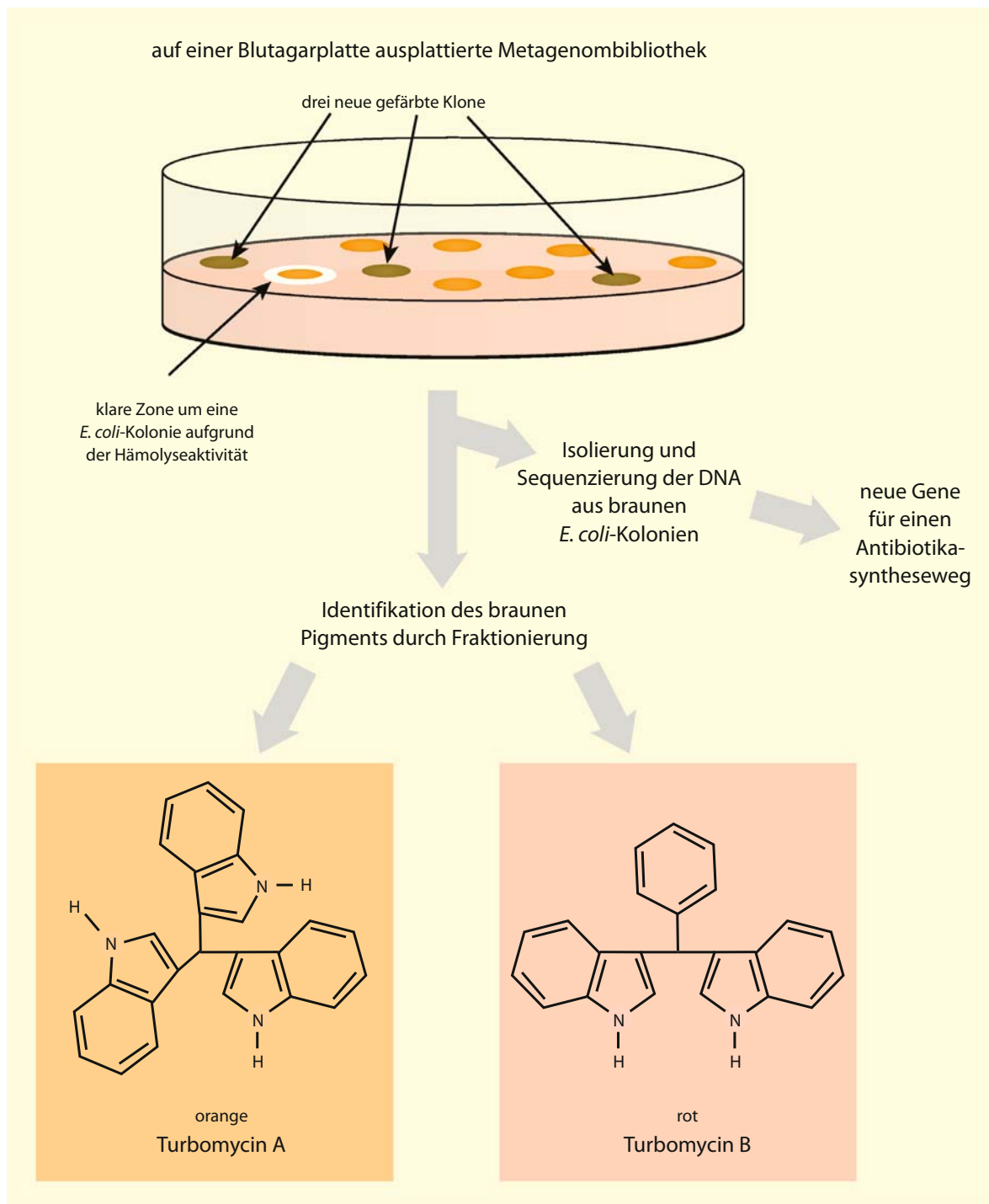
Mithilfe der Metagenomik wurden neue nützliche Gene in der Umwelt entdeckt, beispielsweise für neue Antibiotika, Enzyme, die Schadstoffe abbauen, und Enzyme, die neue Produkte synthetisieren (Tabelle 12.1). Auch in der Vergangenheit wurden durch Erforschung von Mikroorganismen aus der Umwelt zahlreiche nützliche Produkte entdeckt. Anfang des 20. Jahrhunderts erforschte Selman Waksman Actinomyceten im Boden und entdeckte dabei das Antibiotikum Streptomycin. In ähnlicher Weise wurde durch metagenomische Forschungen (per Zufall) ein

weiteres Antibiotikum entdeckt, das Turbomycin. Auf der Suche nach Hämolyysin-verwandten Genen im Boden unterzogen Wissenschaftler eine Metagenombibliothek (s. weiter unten) einem Screening. Hämolyysin ist ein bakterielles Toxin, das die Membranen dafür anfälliger Zellen durchlöchert. Durch die so entstandenen Poren kann der Zellinhalt austreten und die Zelle stirbt ab. Außerdem bewirkt Hämolyysin die Lyse roter Blutkörperchen und erzeugt eine klare Zone um eine Bakterienkolonie auf Blutagarplatten. Einige *E. coli*-Klone aus der Bibliothek wiesen eine dunkelrote oder orange Färbung auf. Bei weiterer Analyse dieser Klone fand man die beiden neuen Antibiotika Turbomycin A und B (Abb. 12.1). Es wurden auch neue biologische Abbauwege in Bakterien festgestellt, die kontaminierte Flächen bewohnen. In Bakterien, die diese Schadstoffe als Energiequelle nutzen, identifizierte man Enzyme, welche die toxischen Wirkungen von Schadstoffen auf Erdölbasis reduzieren. Selbst Bakterien, die in radioaktiv verseuchten Umgebungen gedeihen, wurden entdeckt.

Die Metagenomik erforscht die Genome ganzer Lebensgemeinschaften mikroskopischer Lebensformen. Durch Analysen von DNA-Proben aus der Umwelt konnte man zahlreiche neue Proteine identifizieren.

Tabelle 12.1 Durch *gene mining* identifizierte Gene und Proteine

Gen für	Herkunft der Umweltprobe
Esterasen	hypersaline anoxische Tiefseebecken im Mittelmeer
Lipasen	Bodenproben aus der Umgebung der Universität Göttingen; Bodenproben der landwirtschaftlichen Forschungsstation Madison, Wisconsin, USA
Amylasen	Bodenproben aus der Umgebung der Universität Göttingen; Bodenproben der landwirtschaftlichen Forschungsstation Madison, Wisconsin, USA
Chitinasen	Brackwasser und Wasser aus den Küstengewässern der Delaware Bay, USA
Antibiotika	
Turbomycin A und B	Bodenproben der landwirtschaftlichen Forschungsstation Madison, Wisconsin, USA
Polyketid-Synthasen	Bodenprobe von einem Acker in La Cote Saint André, Isère, Frankreich
Vitaminbiosynthese	mit Avidin angereicherter Waldboden aus der Umgebung von Göttingen; sandiger Boden von einem Strand bei Kavala, Griechenland; Vulkanerde vom Mt. Hood, Oregon, USA
4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	Bodenproben von einem Zuckerrübenfeld bei Göttingen, einer Wiese bei Northeim und aus dem Flusstal der Nieme



12.1 In einer Metagenombibliothek entdeckte neue Antibiotika

Beim Screening einer Metagenombibliothek auf Hämolyseaktivität stellte man drei dunkelbraun gefärbte *E. coli*-Kolonien fest. Der sezernierte Farbstoff erwies sich als Gemisch aus zwei verschiedenen Pigmenten (rot und orange). Die reinen Pigmente zeigen eine starke antimikrobielle Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Durch Sequenzierung des klonierten Inserts konnte man die für die Synthese der Antibiotika verantwortlichen Gene identifizieren. Verändert aus Gillespie *et al* (2002). *Appl Environ Microbiol* 68 (9): 4301–4306.

Anreicherung der Kulturen für Umweltproben

Da eine Metagenombibliothek nur so gut ist wie ihr Inhalt, versucht man das Ausgangsmaterial für metagenomische Forschungen mit verschiedenen Methoden zu verbessern. Zu den Methoden der Anreicherung zählen beispielsweise die Markierung mit stabilen Isotopen (engl. *stable isotope probing*, SIP), BrdU-Anreicherung und suppressive Subtraktionshybridisierung.

Die als ***stable isotope probing* (SIP)** bezeichnete Methode der Markierung mit stabilen Isotopen wurde ursprünglich entwickelt, um Einkohlenstoffverbindungen während ihres Metabolismus durch kultivierte Methylophile (Bakterien, die auf Einkohlenstoffverbindungen wachsen) zu verfolgen. Während des Wachstums der Bakterien konnten markierte Vorstufen der Kohlenstoffverbindungen bis in Fettsäuren verfolgt werden. Diese Methode wurde dann so angepasst, dass man sie auf Umweltproben anwenden konnte, die zum Erstellen von Metagenombibliotheken gesammelt wurden. Dazu wird eine Wasser- oder Bodenprobe aus der Umwelt zunächst mit einer Vorstufe wie Methanol, Phenol, Carbonat oder Ammoniak vermischt, die mit einem stabilen Isotop wie ^{15}N , ^{13}C oder ^{18}O markiert wurden (Abb. 12.2). Wenn die Organismen in der Probe das Vorstufensubstrat verstoffwechseln, wird das stabile Isotop in ihr Genom eingebaut. Bei der anschließenden Isolierung und Trennung der DNA durch Zentrifugation erweisen sich die Genome, die das markierte Substrat eingebaut haben, als „schwerer“ und können von der anderen DNA in der Probe abgetrennt werden. Die schwerere DNA wandert während der Zentrifugation in einem Cäsiumchloridgradienten weiter. Wie weiter unten beschrieben, kann die DNA direkt zur Herstellung einer Metagenombibliothek verwendet oder in Vektoren kloniert werden. Als besonders nützlich erweist sich diese Technik bei der Suche nach neuen Organismen, die Schadstoffe abbauen können wie Phenol in dem abgebildeten Beispiel.

Bei einer verwandten Technik zur Anreicherung der DNA sich aktiv vermehrender Bakterien in einer Umweltprobe wird **5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU)** hinzugegeben. Diese Substanz wird nicht nur in einen Teil der Stoffwechselprodukte der Bakterien eingebaut, sondern in die DNA und RNA sämtlicher Bakterien oder Viren, die sich aktiv vermehren. Man beachte, dass weder abgetötete oder dormante Bakterien oder Viren noch freie DNA durch diese Me-

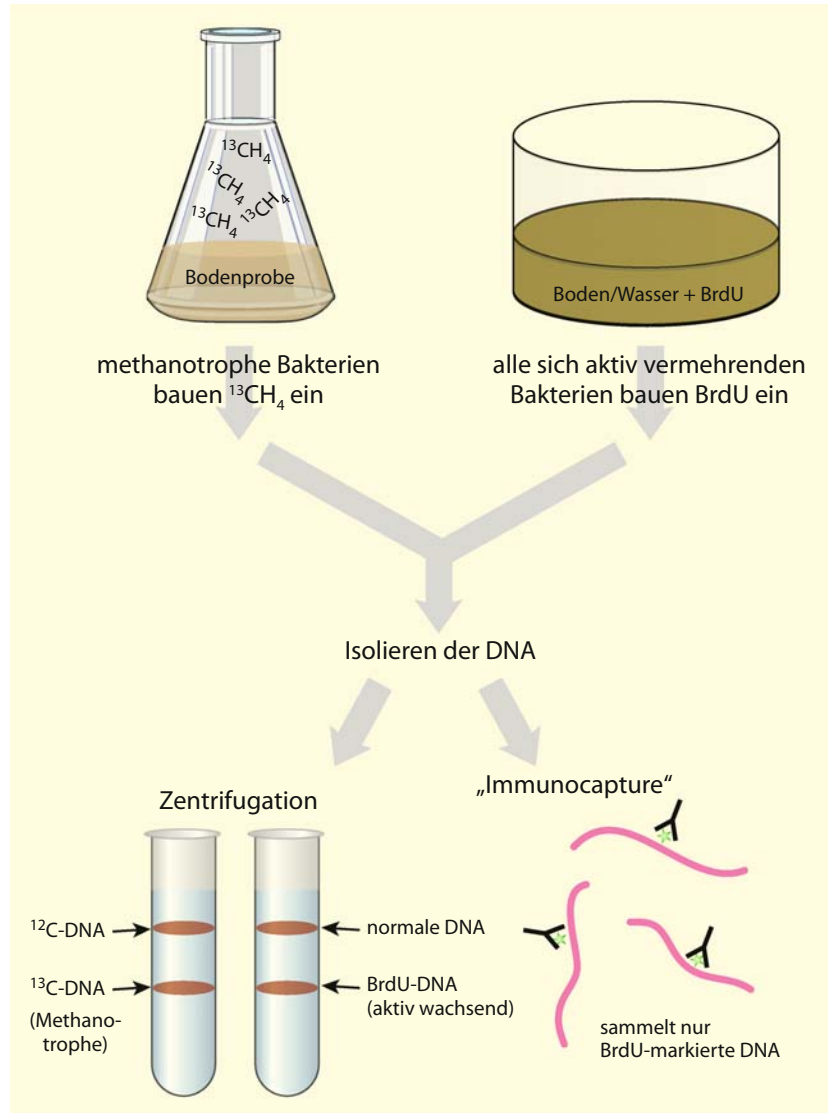
thode markiert werden. Wie zuvor wird die Boden- oder Wasserprobe isoliert und mit BrdU inkubiert. Sämtliche Bakterien, die sich aktiv vermehren, nehmen das Nucleotidanalogen auf und bauen es in ihre DNA ein. Anschließend wird die BrdU-markierte DNA isoliert; dies erfolgt entweder mit Antikörpern gegen BrdU oder durch Dichtegradientenzentrifugation (s. Abb. 12.2).

RNA-SIP zielt darauf ab, RNA (nicht DNA) aus einer Umweltprobe zu isolieren. **SSU-rRNA** (engl. *small subunit ribosomal RNA*), also die 16S-rRNA von Bakterien oder die 18S-rRNA von Eukaryoten, eignet sich hervorragend als Biomarker, denn sie ist essenziell für alles zelluläre Leben. Sie kommt in Zellen in großen Mengen vor und ist bei verschiedenen Arten variabel. Außerdem gibt es eine riesige Datenbank verschiedener SSU-rRNA-Sequenzen, die eine Identifikation relativ einfach machen. Beim RNA-SIP wird die SSU-rRNA in der Umweltprobe markiert. Wie zuvor beschrieben, werden den Proben dazu ^{13}C -markierte Vorstufen bereitgestellt. Diese werden unabhängig von der Zellteilung in die SSU-rRNA eingebaut, weil ribosomale RNA in sämtlichen Zellen produziert wird, die Proteine synthetisieren und nicht nur in Zellen während der Replikation. Diese Technik liefert sowohl Informationen über dormante Bakterien als auch über solche, die aktiver sind. Ähnlich wie zuvor wird die RNA isoliert und mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die rRNA-Banden aggregieren bei der Zentrifugation meist dicht beieinander. Daher müssen die Fraktionen wiederholt aufgetrennt werden. Auch die zuletzt übrig bleibende SSU-rRNA-Fraktion kann noch Spuren von kontaminierenden, nichtmarkierten rRNAs enthalten, sodass man bei deren Beurteilung sehr vorsichtig sein muss.

Mittels RNA-SIP lassen sich viele verschiedene Mikroorganismen in Umweltproben nachweisen. So hat man beispielsweise Wasser aus einer aeroben industriellen Abwasseraufbereitungsanlage auf Phenol-abbauende Mikroorganismen hin analysiert. Dazu wurde das Wasser mit ^{13}C -markiertem Phenol inkubiert und die SSU-rRNA durch Zentrifugation isoliert. Anschließend wurden die rRNAs isoliert und mittels RT-PCR, gefolgt von einer denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese amplifiziert. Die Banden wurden massenspektrometrisch analysiert, um die häufigste rRNA-Sequenz zu ermitteln. Interessanterweise stellte sich ein Organismus der Gattung *Thauera* aus der Gruppe der β -Proteobakterien als sehr häufig heraus, obwohl man diesen gewöhnlich unter denitrifizierenden Bedingungen findet. Vorher

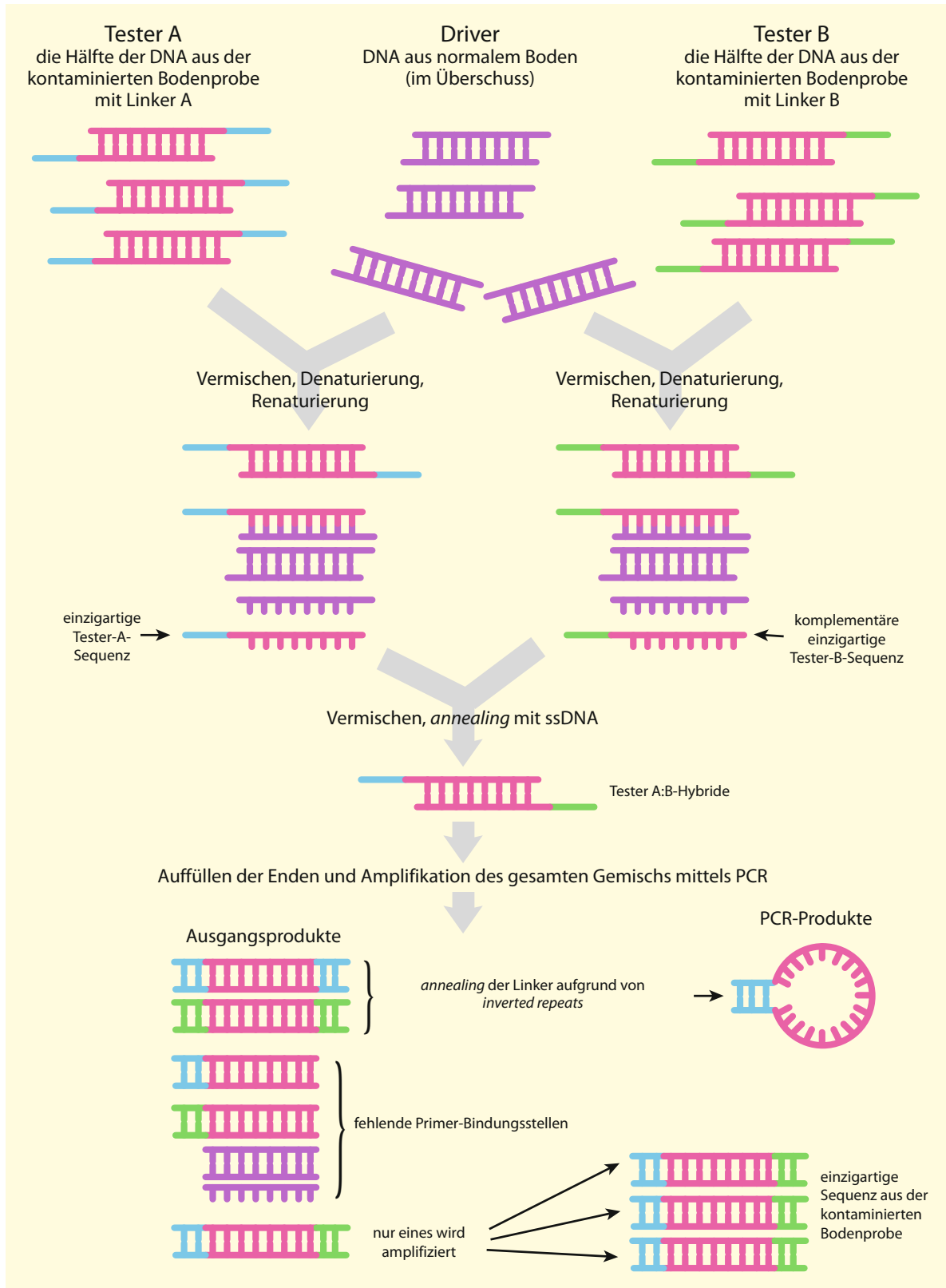
12.2 Stable isotope probing und BrdU-Anreicherung

Umweltproben können für bestimmte Bakterienpopulationen angereichert werden, indem man sie mit einer markierten Vorstufe wie ^{13}C -Methan (links) oder BrdU (rechts) markiert. Nach Isolierung der DNA aus der Probe kann man die markierte DNA mittels Zentrifugation oder „Immunocapture“ von der übrigen Boden-DNA abtrennen.



12.3 Suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH)

Zu Beginn der SSH teilt man die Probe in zwei Hälften auf und gibt jeweils zwei verschiedene Linker hinzu. Anschließend vermischt man beide mit einer großen Menge normaler DNA, wodurch reichlich Tester:Driver-Heterohybride entstehen (die rosa/violett gefärbten Stränge). Jede Probe enthält nach wie vor einige einzelsträngige Abschnitte, die keinen komplementären Strang gefunden haben, darunter auch einige normale oder Driver-DNA und einige Tester-DNA mit einem Linker. Nun werden die beiden Pools vermischt (zu diesem Zeitpunkt liegen sie nicht denaturiert vor). Die einzelsträngigen Abschnitte von Tester A und Tester B lagern sich aneinander und bilden ein Hybridmolekül mit zwei verschiedenen Linkern auf jeder Seite. Durch Auffüllen der einzelsträngigen Bereiche wird der gesamte Pool für die PCR vorbereitet. Dann fügt man die Primer zu den beiden verschiedenen Linkern hinzu. Durch die PCR werden nur die Tester A:Tester B-Heterohybride amplifiziert, weil den anderen Hybriden entweder eine Primer-Bindungsstelle fehlt oder über den Linker ein *self-annealing* erfolgt und sie eine Schleifenstruktur bilden.



war man davon ausgegangen, dass *Pseudomonaden* das Phenol abbauen.

Bei einer anderen Technik zur Anreicherung von Kulturen, der **suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH)**, macht man sich die genetischen Unterschiede zwischen Proben aus verschiedenen Gebieten zunutze. Bei der normalen Subtraktionshybridisierung hybridisiert man zwei verschiedene Proben und entfernt die mRNA, die sich als gleich herausstellt; somit verbleibt nur noch jene mRNA, die sich in den beiden Proben unterscheidet (s. Kap. 3). Nach dem gleichen Prinzip funktioniert die SSH. Zunächst muss man zwei unterschiedliche Bedingungen schaffen. Beispielsweise kann man eine Bodenprobe von einem verseuchten Standort mit einer aus der Nähe, von einem nicht kontaminierten Boden, vergleichen. Die beiden Bodenproben werden einen unterschiedlichen Gehalt an Mikroorganismen aufweisen. Mikroorganismen, die an der kontaminierten Stelle besonders häufig vorkommen, verarbeiten den Schadstoff möglicherweise in ihrem Stoffwechsel.

Nach Isolation der DNA der beiden Proben dient die kontaminierte Bodenprobe als sogenannte **Tester-DNA**, die Probe des „normalen“ Bodens als **Driver**. Die Tester-DNA wird aufgeteilt in zwei Hälften; an deren Enden werden jeweils verschiedene Linker gekoppelt, sodass sich ein Tester A und ein Tester B ergeben. Anschließend werden Tester A (mit Linker A), Tester B (mit Linker B) und Driver-DNA gemischt, denaturiert, um Einzelstränge zu erhalten, und danach neu hybridisiert. Die Driver-DNA liegt gegenüber den Testern im Überschuss vor. Das gewährleistet, dass DNA-Fragmente von Bakterien außerhalb des kontaminierten Bereichs in größerer Zahl vorliegen als Bakterien von der kontaminierten Stelle. Die Driver-DNA bildet durch *annealing* mit allen häufigen DNA-Fragmenten doppelsträngige Hybride, von denen jeweils nur ein Strang mit dem Linker gekoppelt ist. Sämtliche einzigartige Tester-DNA, die in dem nicht kontaminierten Boden nicht vorkommt, kann ungehindert mit sich selbst hybridisieren und A:A-, B:B- oder A:B-Hybride bilden. Dem Hybridisierungsgemisch werden noch zusätzlich PCR-Primer beigelegt; ein Primer erkennt Linker A, der andere Linker B. Wie in Abbildung 12.3 zu sehen, werden durch die PCR ausschließlich Tester:Tester-Hybride amplifiziert. Da A:A- und B:B-Hybride gegenläufige Linker aufweisen, bilden diese Hybride während des *annealing* eine pfannenähnliche Struktur und werden bei der PCR nicht amplifiziert. Es erfolgt also nur eine Amplifikation der A:B-Hybride, und diese repräsentieren einzigartige Sequenzen, die sich nur in der kontaminierten Probe finden.

Beim *stable isotope probing* (SIP) werden einer Umweltprobe schwere Isotope zugefügt. Dadurch lassen sich Bakterien oder Viren, die sich aktiv vermehren, von den übrigen Organismen unterscheiden.

RNA-SIP ähnelt SIP, nur werden hierbei die schweren Isotope in die SSU-rRNA eingebaut. Für diese Sequenzen müssen die Organismen keine Zellteilung durchmachen, sie müssen aber metabolisch aktiv sein.

Mit der suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) kann man in zwei verschiedenen Proben vorhandene Mikroorganismen vergleichen; dazu eliminiert man identische DNA und unterzieht die einzigartigen Sequenzen einer genaueren Analyse.

Sequenzabhängige Techniken in der Metagenomik

Früher wurden die sequenzabhängigen Techniken in der Metagenomik direkt an kultivierten Proben aus der Umwelt durchgeführt. Im Jahr 1985 sequenzierten Pace und Kollegen die 5S- und 16S-rRNA-Gensequenzen direkt an Umweltproben ohne Kultur. Zu jener Zeit war dies technisch schwierig. Einfacher gestaltete sich die Analyse spezifischer Organismengruppen ab Anfang der 1990er-Jahre, als mehr und mehr die PCR-Techniken Einzug hielten. Mithilfe von PCR-Primern, die spezifisch für 16S-rRNA-Sequenzen waren, identifizierten Wissenschaftler die verschiedenen Organismen in einer Umweltprobe. Diese Techniken setzen gewisse Kenntnisse der Sequenzen voraus. Überdies lässt sich ein neuer Organismus mit dieser Methode nur anhand seiner 16S-rRNA-Sequenz identifizieren. Über die Physiologie oder Genetik des Organismus erhält man dadurch keine Informationen.

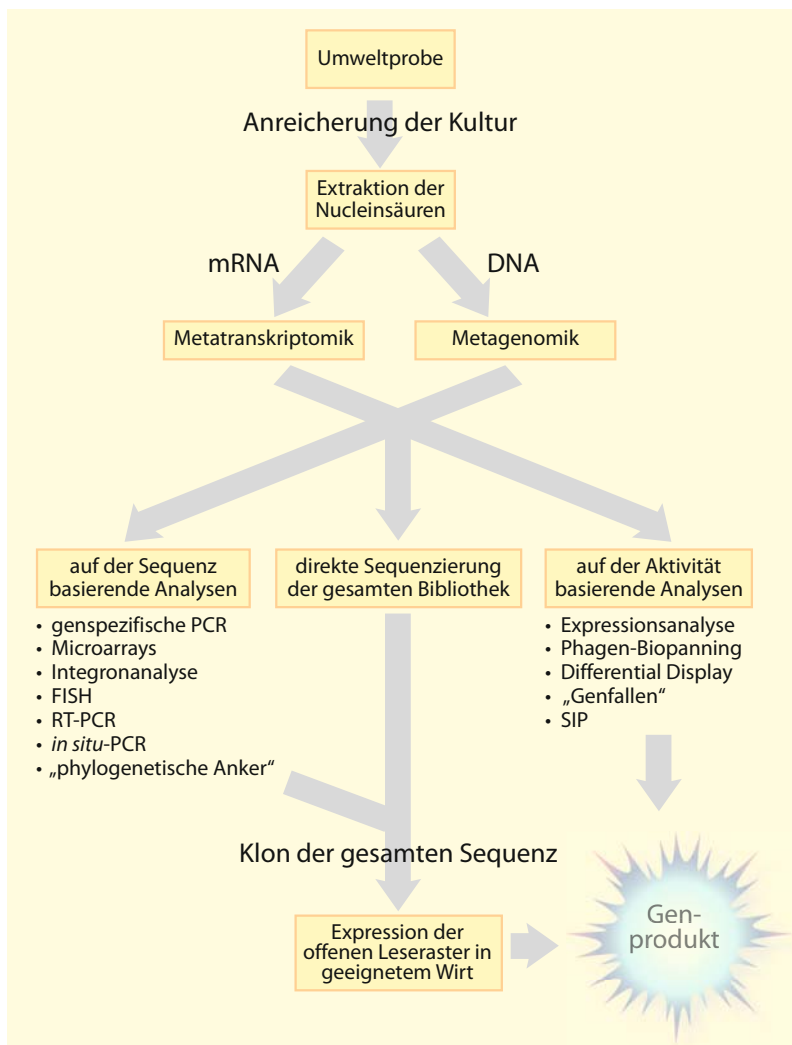
Durch das Erstellen von **Metagenombibliotheken** kann man die gesamte genetische Ausstattung neu entdeckter Lebensformen identifizieren, ohne diese vorher kultivieren zu müssen. Aus der Genomsequenz kann man dann die Physiologie und Funktion des Organismus ableiten. Dazu isoliert man DNA (oder RNA) aus der Umwelt (in einigen Fällen erfolgt noch eine Anreicherung, wie zuvor beschrieben). Anschließend erstellt man aus der DNA, die ein Gemisch von Fragmenten zahlreicher Genome darstellt, eine Bibliothek. Solche Bibliotheken ähneln herkömmlichen Genombibliotheken, mit der Aus-

nahme, dass die Ausgangs-DNA Sequenzen vieler verschiedener Organismen enthält und nicht nur die eines einzigen.

Im Grunde kloniert man die gesamte aus einer Umweltprobe isolierte DNA in einen Plasmidvektor und überführt diese Konstrukte in *Escherichia coli*. Natürlich gelten für diese Bibliothek die gleichen Permutationen wie für eine Bibliothek aus nur einem einzigen Genom. Große DNA-Fragmente können in künstliche Bakterienchromosomen (BACs, *bacterial artificial chromosomes*) kloniert werden, kleine Abschnitte in Plasmide. Um festzustellen, ob ein bestimmtes Enzym oder Protein in der Bibliothek vorhanden ist, kann man die DNA aus der Umweltprobe in Expressionsvektoren klonieren. Aus Umweltproben isolierte mRNA kann man auch vor dem Klonie-

ren mithilfe von Reverse Transkriptase in cDNA konvertieren. Eine solche cDNA-Bibliothek repräsentiert Gene, die in der Umwelt aktiv exprimiert werden. Durch diese Methode vermeidet man eine Klonierung nichtcodierender DNA. Natürlich gelten die gleichen Vorbehalte: Die Bibliothek ist immer nur so gut wie ihre Ausgangs-DNA oder -mRNA. Ist diese verunreinigt oder in kleine Stücke zerschnitten, ist die Bibliothek wertlos. Außerdem kann es vorkommen, dass ein Teil der DNA aus der Umweltprobe nicht in der Bibliothek repräsentiert ist, weil er sich nicht isolieren lässt.

Man kann Metagenombibliotheken sequenzieren, um neue Gene zu finden, oder auf neue Proteinfunktionen analysieren (Abb. 12.4). Viele Umweltbiologen wollen neue Enzyme entwickeln oder finden, die



12.4 Techniken für die Analyse von Umweltproben

Aus Umweltproben isolierte DNA oder mRNA kann man mit vielen verschiedenen Techniken analysieren. Sämtliche Methoden laufen darauf hinaus, das Genprodukt und dessen Funktion in der Umwelt zu ermitteln.

Schadstoffe oder verunreinigende Substanzen abbauen. Durch Screening der Bibliothek mit einer Sequenz, die konservierte Domänen bekannter Enzyme enthält, kann man neue Enzyme finden. Auf ähnliche Weise kann man mithilfe von PCR-Primern für konservierte Domänen bekannter Enzyme nie zuvor identifizierte Gene aus der Bibliothek amplifizieren. So ermöglichen beispielsweise aromatische Oxygenasen den Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe, wie sie in Erdöl und Kohle vorkommen. Diese Schadstoffe werden von verschiedenen Organismen abgebaut. Deren Gene und die daran beteiligten Reaktionswege bilden wesentliche Ziele für das sogenannte Stoffwechsel-Engineering (engl. *pathway engineering* oder auch *metabolic engineering*; s. Kap. 13). Durch Verwendung von PCR-Primern für konservierte Regionen bekannter aromatischer Oxygenasen kann man die Gene für neue (aber verwandte) Oxygenasen in den Umweltproben identifizieren.

Auf der Sequenz beruhende Analysen für Metagenombibliotheken sind beispielsweise Microarrays (s. Kap. 8), FISH (s. Kap. 3), RT-PCR (s. Kap. 4), Sequenzierung mithilfe von „phylogenetischen Ankern“ (engl. *phylogenetic anchors*) und Integronanalyse (s. unten). Für die Sequenzierung mit phylogenetischen Ankern identifiziert man zunächst die Sequenz eines bekannten Gens. Oft wird als Erstes ein Markergen wie das 16S-rRNA-Gen identifiziert, anschließend erfolgt dann die Sequenzierung der Regionen stromaufwärts und stromabwärts des Markers.

So hat man beispielsweise eine 16S-rRNA-Sequenz aus Meerwasser als spezifisches Genomfragment von γ -Proteobakterien identifiziert. Dem 16S-rRNA-Gen benachbart befand sich ein Gen, das dem für Bacteriorhodopsin ähnelte, einer Transmembranprotonenpumpe, die auf Licht reagiert. Ursprünglich dachte man, die Gene für Bacteriorhodopsine existierten nur bei Archaea. Wie diese Analyse zeigte, weisen andere Meeresbewohner ähnliche Gene auf.

Auch mit Microarrays kann man Typen und Anzahl verschiedener Organismen in einer Umweltprobe ermitteln. Dazu erstellt man zunächst einen Microarray aus einzigartigen Sequenzen bekannter Organismen. Auf diesen wird dann die fluoreszenzmarkierte DNA aus der Umweltprobe hybridisiert. Die Ergebnisse können bestätigen, ob ein bestimmtes Bakterium, Virus oder Gen vorhanden ist oder nicht; die relative Häufigkeit kann man anhand der Intensität der Fluoreszenz feststellen. Ähnliche Informationen erhält man mittels FISH und RT-PCR. Hier wird die DNA der Umweltprobe nur mit wenigen Sonden beziehungsweise Primern analysiert. Die Ergebnisse sind sehr viel direkter und darauf ausgerichtet, bekannte Organismen zu identifizieren.

Mit der **Integronanalyse** (engl. *integron analysis*) kann man offene Leseraster feststellen, die von Integrons verwendet werden; damit lassen sich mehr neue, bislang unbekannte Gene identifizieren als mit den bisher genannten Techniken (Abb. 12.5). **Integrons** sind verwandt mit Transposons (s. Kap. 1) und

Exkurs 12.1

Sequenzierung der Sargasso-See

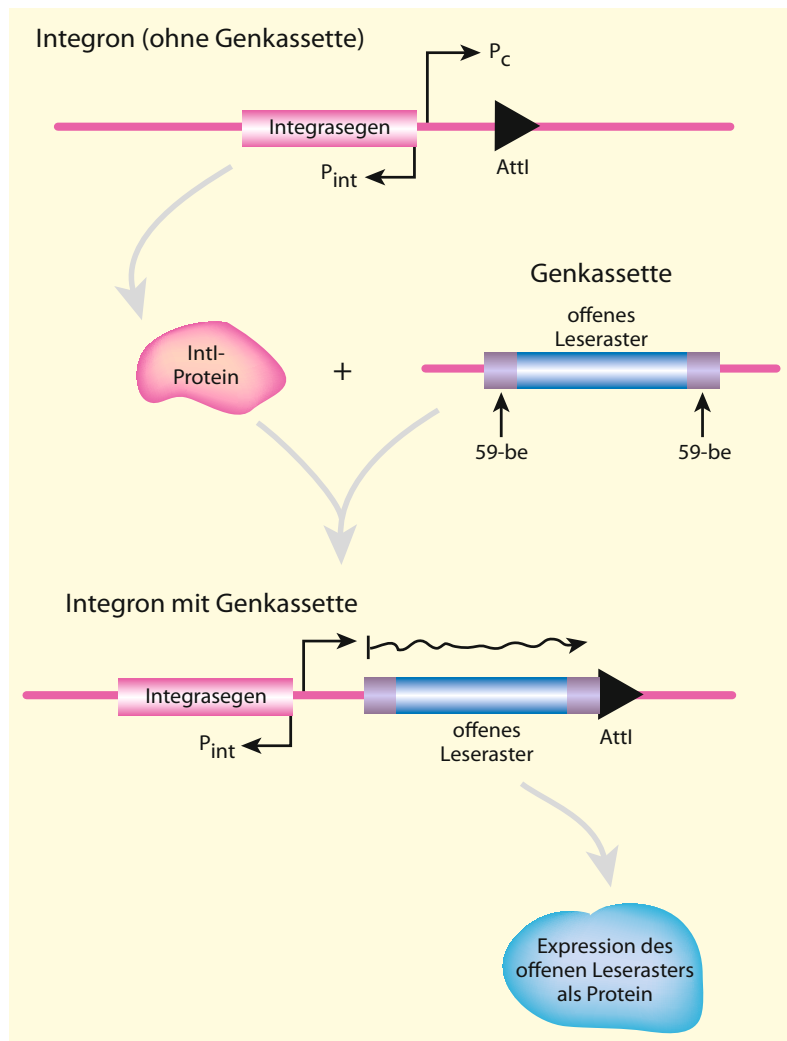
Im Jahr 2004 veröffentlichte das Wissenschaftsmagazin *Science* eine der umfassendsten Metagenomanalysen (*Science* 304: 66–74). Craig Venter (der mit seiner Firma das menschliche Genom sequenzierte) setzte sich in einem großangelegten Unterfangen zum Ziel, die aus der Sargasso-See isolierte DNA zu sequenzieren. Die Sargasso-See ist ein Bereich des Nordatlantik mit relativ hohem Salzgehalt. Daher vermutete man hier eine geringere Biodiversität. Auf einer Fahrt mit seinem Segelboot entnahm er an verschiedenen Stellen in rund anderthalb Metern Tiefe Wasserproben. Nach dreimaligem Filtern mit jeweils immer feineren Filtern wurden die Wasserproben eingefroren. Die Filter sandte er von Zeit zu Zeit zur DNA-Sequenzierung nach Maryland. Dort wurde die DNA extrahiert und mit hohem Druck durch eine kleine Öffnung gepresst, um sie in kleine Abschnitte zu zerlegen. Ähnlich wie bei der Analyse des menschlichen

Genoms wandte Venters Forschungsgruppe die Methode der *shotgun*-Sequenzierung an und ließ die überlappenden Sequenzabschnitte dann per Computer zusammensetzen. Wie sich bei diesen Analysen herausstellte, weist die Sargasso-See mit rund 1800 verschiedenen Arten von Mikroorganismen einen höheren Artenreichtum auf, als erwartet. Gefunden wurden 150 neue Arten von Bakterien und Archaea sowie über 1,2 Millionen neue Gene. Interessanterweise entdeckten die Wissenschaftler auch mehr als 700 verschiedene Bacteriorhodopsingene. Mithilfe von Bacteriorhodopsin machen sich Bakterien die Energie des Lichtes zunutze; es ist nahe verwandt mit Rhodopsin, dem lichtempfindlichen Protein in den Augen von Säugetieren. Die bei diesen Forschungen ermittelten Sequenzen sind für alle Interessierten kostenlos online abrufbar auf der Webseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

von besonderer Bedeutung für die Ausbreitung von Genen für Antibiotikaresistenz und andere Eigenschaften, durch die der Wirt in einer bestimmten Umgebung einen Wachstumsvorteil erlangt. Bei Integrons handelt es sich um genetische Elemente mit einer Erkennungsstelle (*attI*) für den Einbau eines als **Genkassette** bezeichneten DNA-Abschnitts, einem Promotor zur Expression der Genkassette (P_c) und einem Gen für **Integrase** (*intI*) – das Enzym, welches die Rekombination der Genkassette in das Integron bewirkt. Genkassetten sind DNA-Abschnitte mit einem oder zwei offenen Leserastern (ORF, engl. *open reading frame*) ohne Promotoren, flankiert von **59-Basen-Elementen** (59-be, auch als *attC*-Stellen bezeichnet). Wenn die Integrase die 59-be-Sequenz erkennt, schneidet sie die Genkassette heraus und

baut sie stromabwärts des P_c -Promotors ein. Das ermöglicht die Expression des offenen Leserasters in Protein. Die 59-be-Sequenzen können unterschiedlich lang sein, müssen jedoch eine sieben Nucleotide umfassende konservierte Sequenz enthalten.

Die Genkassetten sind der interessante Teil des Szenarios und der Schlüssel zur Integronanalyse. Erstmals identifiziert wurden Genkassetten, weil sie vielfach Antibiotikaresistenzgene codieren; sie können jedoch Gene aller Art codieren. Durch ein Screening von Metagenombibliotheken mithilfe von PCR-Primern, welche die 59-be-Sequenzen erkennen, kann man diese offenen Leseraster amplifizieren. Mit dieser Methode konnte man neue Gene identifizieren, die mit denen für DNA-Glykosylasen, Phosphotransferasen und Methyltransferasen verwandt sind.



12.5 Integronanalyse

Integrons sind genetische Elemente, die Genkassetten einbauen und exprimieren. Ein Integron enthält drei Hauptbestandteile: Ein Integrasegen unter Kontrolle seines eigenen Promotors (P_{int}), eine *attI*-Sequenz zum Einbau der Genkassette und einen Promotor zur Expression der Genkassette (P_c). Wenn die Integrase exprimiert wird, sucht sie das Genom nach Genkassetten ab. Diese schneidet die Integrase dann heraus und baut sie an der *attI*-Sequenz in das Integron ein. Mithilfe von PCR-Primern für 59-be-Sequenzen kann man sämtliche offenen Leseraster in Genkassetten isolieren und potenziell neue Gene identifizieren.

Außerdem kann man so auch neue Antibiotikaresistenzgene finden. Die Integronanalyse erweist sich ebenfalls als nützlich für die Erforschung der bakteriellen Evolution und des Gentransfers, weil diese Elemente während der Konjugation von Bakterium zu Bakterium übertragen werden können.

Mit Metagenombibliotheken kann man die gesamte genetische Ausstattung neu entdeckter Lebensformen identifizieren, ohne dazu den Organismus kultivieren zu müssen.

DNA aus Umweltproben kann man mit verschiedenen Methoden analysieren, zum Beispiel FISH, Microarrays, Sequenzierung und RT-PCR.

Durch Analyse der an bekannte Gene angrenzenden Regionen kann man neue Gene mit vielen verschiedenen Funktionen identifizieren. Man spricht hier von einer Sequenzierung mithilfe „phylogenetischer Anker“.

Integrone ähneln Transposons, haben jedoch die Fähigkeit, Gene verschiedener Organismen einzufangen und diese auf andere zu übertragen. Bei einer Integronanalyse einer Metagenombibliothek wird mittels PCR die Sequenz zwischen den 59-be-Sequenzen amplifiziert, welche die vom Integron eingefangenen Gene erkennt.

Auf Funktion oder Aktivität beruhende Umweltanalysen

Neben den auf Sequenzen beruhenden Methoden kann man Metagenombibliotheken auch auf verschiedene Funktionen hin analysieren (Abb. 12.6). Zu den funktionellen Methoden gehören beispielsweise Expressionsanalysen mit verschiedenen „Genfallen“ (engl. *genetic traps*) und das Phagen-Biopanning. Selbst die bereits beschriebene Methode des *stable isotope probing* könnte man als funktionsbasierte Methode kategorisieren, sofern es sich bei dem markierten Substrat um einen spezifischen Metaboliten handelt, der die Kultur auf Basis der Stoffwechselfunktion anreichert. Der Analyse einer Metagenombibliothek durch Sequenzierung sind Grenzen gesetzt. Zum einen lässt sich die Funktion zahlreicher Gene fremder Organismen nicht von deren Sequenz ableiten. Zum anderen kann es vorkommen, dass man eine völlig neue Klasse von Genen gar nicht findet, wenn man nur mit bekannten Genen nach neuen Mitgliedern einer Genfamilie sucht. Für die

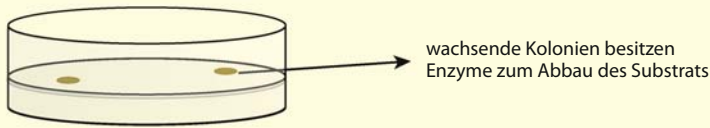
Suche nach Enzymen, die Bacteriorhodopsin ähneln, würden Wissenschaftler zur Analyse der Bibliothek beispielsweise Primer verwenden, die bekannten Bacteriorhodopsinen gleichen. Damit würden sie sicher einige Gene identifizieren, andere jedoch nicht, wenn ihre Sequenzen zu sehr abweichen. Bei einer Analyse dieser Bibliothek auf Protonenpumpen, die auf Licht reagieren, würde man hingegen sämtliche Enzyme identifizieren, die diese Funktion erfüllen, ganz gleich, welche Sequenz sie aufweisen.

Die Expressionsanalyse ist von der Wahl des Expressionsvektors abhängig. Die Expression von Proteinen aus metagenomischen DNA-Fragmenten erfolgt, wenn man diese in einen Vektor mit Start- und Stoppssequenzen für die Transkription und Translation kloniert. Anschließend muss man sich einen einfachen Test für die Zielfunktion ausdenken. Beispielsweise kann man die Bibliotheksklone auf einem bestimmten toxischen Schadstoff ausplattieren. Wenn eines der Bibliotheksinserats für ein Enzym codiert, das den Schadstoff abbaut, wird dieser spezielle Bibliotheksklon wachsen. Das DNA-Insert kann man dann isolieren und sequenzieren.

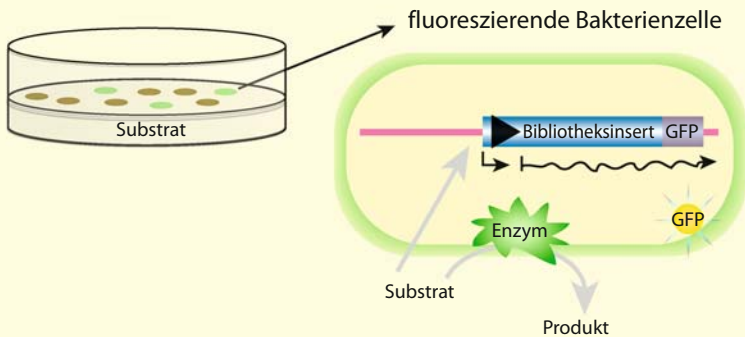
Für eine weitere funktionelle Analyse verknüpft man metagenomische DNA „in frame“ mit einem Gen für grün fluoreszierendes Protein (GFP), dem der Promotor fehlt. Die Gene vieler Enzyme werden durch deren eigene Substrate angeschaltet. Wird dieser Typ Gen vor ein Promotor-loser GFP kloniert, so erfolgt die Regulation des GFP-Gens durch dasselbe Substrat. Ist das interessierende Substrat im Wachstumsmedium für die Bibliothek enthalten, werden sämtliche Klone mit Genen, die durch das Substrat aktiviert werden, ebenfalls GFP produzieren. Dies zeigt sich in einer grünen Fluoreszenz der Zellen. Eine schnelle und einfache Möglichkeit zur Isolierung der fluoreszierenden Klone bietet die Durchflusszytometrie (FACS, s. Kap. 6).

Das größte Hindernis für funktionsbasierte Analysen ist eine erfolgreiche Genexpression. Den Wirtsorganismus (z.B. *E. coli*) zur Expression fremder Gene zu veranlassen, ist eine Art Glücksspiel: Manche Genprodukte wirken toxisch auf den Wirtsorganismus, manche benötigen zur Expression andere Faktoren, und wieder andere haben vielleicht eine sehr geringe Aktivität. Ein weiteres Problem stellt ganz einfach die Menge dar. Gewöhnlich ist die Zahl potenzieller Klone, die ein gewünschtes Gen enthalten, gering; daher müssen riesige Mengen von Klonen analysiert werden, um nur ein oder zwei Gene zu identifizieren. So wurden beispielsweise die Lipasen, die in Bodenproben aus Deutschland identifiziert wurden (s. Tabelle 12.1), nur in einem

a Expressionsanalyse

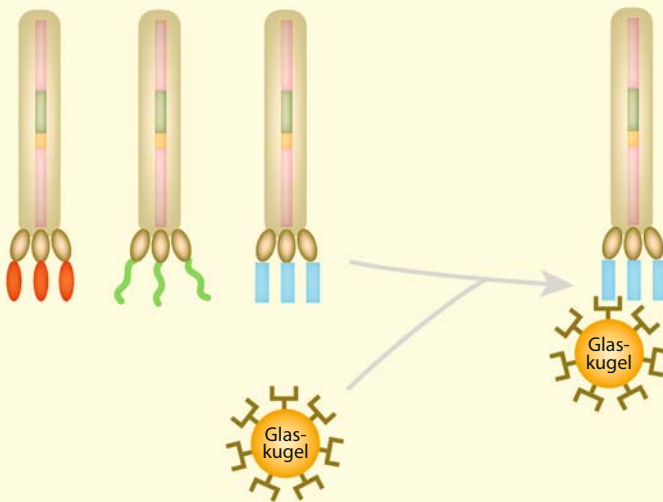


b Assoziationsanalyse



c Phagen-Biopanning

Phage mit verschiedenen Peptiden der Metagenombibliothek an der Oberfläche



12.6 Auf der Funktion beruhende Methoden in der Metagenomik

a Bei einer Expressionsanalyse (engl. *expression screening*) werden jene Klone identifiziert, die durch Verstoffwechselung eines bestimmten Substrats wachsen. Um das Wachstum anderer Bibliotheksklone zu unterdrücken, muss dieses Substrat die einzige Quelle für Kohlenstoff, Stickstoff oder Schwefel in einem Minimalmedium sein. **b** Durch Assoziationsanalyse (engl. *guilt-by-association*) kann man exprimierte Gene identifizieren, deren Produkte ein bestimmtes Substrat metabolisieren. Voraussetzung ist, dass der natürliche Promotor für die verantwortlichen Gene ebenfalls vorhanden ist, sofern die in die Bibliothek eingebaute Sequenz (Bibliotheksinsert; engl. *library insert*) für die Verstoffwechselung des Substrats verantwortlich ist. Ist dieser Promotor aktiv, so kann er ein Reportergen wie *gfp* exprimieren, welches für das grün fluoreszierende Protein codiert. Positive Zellen können dann durch Durchflusszytometrie (FACS, engl. *fluorescent activated cell sorting*; s. Kap. 6) von den anderen isoliert werden. **c** Mittels Phagen-Biopanning kann man Proteinbindungspartner identifizieren. Dazu werden Peptide aus einer Metagenombibliothek an ein Hüllprotein eines Bakteriophagen gekoppelt und auf dessen extrazellulärer Oberfläche exprimiert. Bringt man den Phagen mit dem interessierenden Bindungspartner zusammen (immobilisiert an einer Glaskugel), binden jene Metagenompeptide, die an das interessierende Protein binden, an die Kugel und lassen sich leicht vom Rest des Phagenklons isolieren.

von 730 000 Metagenomklonen gefunden. In einem anderen Fall fand man beim Screening von 1 480 000 Klonen lediglich zwei neue Na^+/H^+ -Antiporter. Aus diesem Grund sind die Methoden zur Anreicherung der Kultur ein bedeutender Aspekt beim Erstellen von Metagenombibliotheken (s. weiter vorne).

Beim Phagen-Biopanning in der Metagenomik wird im Grunde die gleiche Methode angewandt

wie beim Phagen-Display (s. Kap. 9). Klonierte DNA-Inserts werden als Fusionsproteine mit einem Phagenhüllprotein auf der Phagenoberfläche exprimiert. Weil die an der Oberfläche exprimierten Proteine nur Abschnitte von Fremdproteinen tragen, spielen die mit einer heterologen Expression einhergehenden Probleme hier nur eine untergeordnete Rolle. Die klonierte DNA stammt von irgendwelchen in

der Umweltprobe enthaltenen Organismen. Somit könnten die exprimierten Proteinabschnitte Teil eines Enzyms, eines Membranproteins usw. sein. Der Erfolg einer Phagen-Display-Bibliothek hängt daher von der Screening-Methode ab. Mittels Phagen-Biopanning kann man beispielsweise Bindungspartner für einen bestimmten Schadstoff, Metaboliten oder selbst für ein anderes Protein identifizieren. Ist das Zielmolekül an einer Glaskugel immobilisiert, so werden sämtliche Phagen, die ein an das Zielprotein bindendes Proteinsegment tragen, an der Kugel haften bleiben. Danach kann man den Phagen isolieren und das DNA-Insert sequenzieren, um die dafür verantwortliche Sequenz zu ermitteln.

Durch Screening der metagenomischen Expressionsbibliothek auf eine bestimmte Funktion, wie das Wachstum auf einem Schadstoff, lassen sich neue Gene identifizieren, deren Produkte diesen Schadstoff abbauen.

Bei einer Expressionsanalyse ist die Metagenombibliothek eine Expressionsbibliothek, d.h. der Vektor enthält die Initiations- und Terminationssequenzen für die Transkription und Translation. Steht dem Bibliotheksklon zum Wachstum nur ein einziges Substrat zur Verfügung, so vermehren sich nur jene Klone, die das Substrat tatsächlich verstoffwechseln können.

Assoziationsanalysen beruhen darauf, dass das Bibliotheksinsert die natürlichen Promotoren enthält, die vom Substrat reguliert werden. Wenn das Substrat seinen natürlichen Promotor aktiviert, enthalten die Vektorsequenzen ein Reportergen, das exprimiert wird.

Durch Phagen-Biopanning lassen sich Probleme vermeiden, wie sie bei der Expression so vieler verschiedener Gene einer Metagenombibliothek entstehen. Durch diese Methode lassen sich neue Bindungspartner für ein bestimmtes Protein oder Substrat identifizieren.

symbiontischer Organismen ermittelt. Zum Beispiel leben Bakterien der Gattung *Buchnera* symbiontisch in Blattläusen. Diese Bakterien produzieren für die Blattläuse essenzielle Aminosäuren. Als Gegenleistung liefern die Blattläuse den Bakterien Kohlenstoff und Energiequellen. Diese Beziehung ist so verflochten, dass keiner der beiden Organismen ohne den anderen leben kann. Die Bakterien haben so viele ihrer ursprünglichen Funktionen eingebüßt, dass man sie beinahe als Organellen bezeichnen könnte. Da es keine Möglichkeit gibt, die Bakterien außerhalb von Blattläusen zu kultivieren, lässt sich keine herkömmliche Genombibliothek erstellen. Daher erstellte und sequenzierte man stattdessen eine Metagenombibliothek, die sowohl DNA der Blattläuse als auch von *Buchnera* enthielt. Das tatsächliche Ausmaß der wechselseitigen Abhängigkeit kam erst ans Licht, als man beide Genome analysierte.

Ganz ähnlich ging man vor, als man das gesamte Genom von Bakterien aus Bartwürmern (*Pogonophora*) aus der Tiefsee sequenzierte. Die Bartwürmer leben in der Umgebung von Hydrothermalschloten in einer schwefelreichen Umgebung mit Temperaturen von bis zu 400 °C. Die Würmer besitzen weder Mund noch Verdauungstrakt und sind für ihre Ernährung völlig auf symbiontische Vertreter der Proteobakterien angewiesen. Die Bakterien leben in einer spezialisierten Struktur, dem sogenannten Trophosom, und oxidieren dort Schwefelwasserstoff zur Energiegewinnung. Mithilfe dieser Energie stellen sie Aminosäuren her, von denen sich der Wurm ernährt. Im Gegenzug sammelt der Wurm Schwefelwasserstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid und transportiert diese zu den Bakterien. Die Metagenombibliothek enthielt sowohl Bartwurm- als auch Bakteriengenome, lieferte jedoch zuvor unbekannte Informationen über die Bakterien. So besaßen die Bakterien zum Beispiel Gene für Flagellen, was darauf schließen lässt, dass sie möglicherweise auch eine mobile Phase aufweisen. Tatsächlich legen andere Beobachtungen nahe, dass die Bakterien sich durch das Meerwasser fortbewegen und andere junge Würmer besiedeln.

Die Metagenomik kann auch dazu beitragen, die Konkurrenz und Kommunikation unter Mikroorganismen zu verstehen. Diese Forschungen könnten weitreichend Anwendung in vielen Umwelten finden. Mittels funktioneller Metagenomik kann man kleine Moleküle identifizieren, die für das Überleben der Mikroorganismen wichtig sind, etwa Antibiotika. Metagenombibliotheken können mittels funktioneller Tests zur Identifikation neuer Antibiotika auf Antimikrobenaktivität hin untersucht werden. Zusätz-

Ökologie und Metagenomik

Wie in der Einführung erwähnt, werden in der Metagenomforschung in Umweltproben enthaltene Bakterien, Viren und selbst einfache „genetische Einheiten“ analysiert. Die Ergebnisse dieser Forschungen können in vielen Bereichen von praktischem Nutzen sein, unter anderem auch in der ökologischen Forschung. So hat man beispielsweise mittels Metagenomtechniken die gesamte Genomsequenz

lich kann man mit sequenzbasierten Analysen der Metagenombibliotheken Synthesen identifizieren, die neue Polyketide herstellen können (das sind Antibiotika, die mit Erythromycin und Rifampicin verwandt sind; zur Polyketidsynthese s. Kap. 13). Mit weiteren funktionellen metagenomischen Screenings konnte man Quorum-sensing-Moleküle identifizieren. Diese sind Indikatoren für die Populationsdichte von Bakterien. Da viele Bakterien nur dann Eukaryotenzellen infizieren oder Toxine bilden, wenn sie in ausreichender Zahl vorhanden sind, bietet das Eingreifen in den bakteriellen Kommunikationsprozess des Quorum sensing eine neue Möglichkeit der antibakteriellen Therapie. Somit ist dieses Gebiet von direkter klinischer Bedeutung. Durch Koexpression von Metagenomklonen mit dem Reporter GFP konnte man neue Quorum-sensing-Moleküle identifizieren. Wenn die Klonen ein Quorum-sensing-Molekül exprimieren, aktiviert dies die Expression von GFP und bringt die Bakterien zum Fluoreszieren. Anschließend kann man den Quorum-sensing-Metagenomklon mittels FACS oder mikroskopisch isolieren, sequenzieren und so die Identität der beteiligten Gene feststellen.

Das Identifizieren neuer Gene mithilfe der Metagenomik erweist sich als sehr vielversprechend für das Verständnis unserer Umwelt und potenziell auch für die Lösung einiger Gesundheitsprobleme des Menschen.

Natürliche Attenuation von Schadstoffen

Auch in der biogeochemischen Forschung kann man die Metagenomik einsetzen. Wenn wir wissen, wie sich Bakterien auf die Umwelt auswirken, werden wir dadurch vielleicht auch Wege finden, das Überleben unserer eigenen Art zu sichern. Erkenntnisse, wie es Bakterien schaffen, in extremen Umwelten zu überleben, bringen vielleicht für die Biotechnologie nützliche biochemische Prozesse ans Licht. Am bedeutendsten ist jedoch: Wenn wir herausfinden, wie Bakterien mit Schadstoffbelastungen zurecht kommen, ist es eventuell möglich, an nützliche Enzyme zu gelangen, um die von uns selbst verursachte Umweltverschmutzung zu beseitigen.

Rasche Fortschritte hat die Biotechnologie beispielsweise auf dem Gebiet der **biologischen Sanie-**

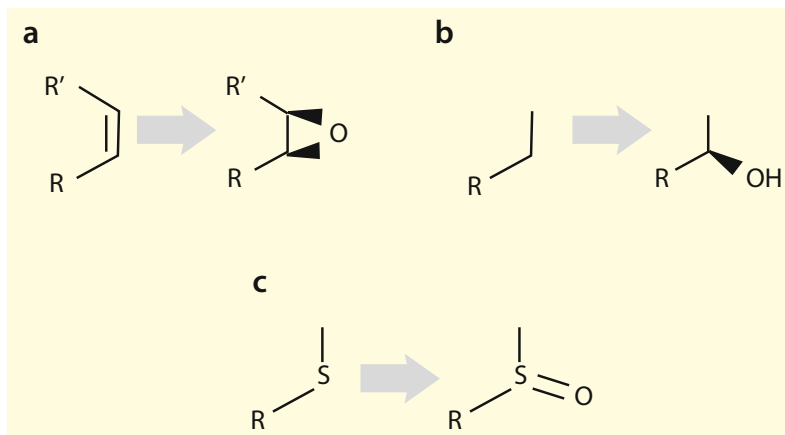
rung oder **Bioremediation** gemacht. Unsere Umwelt ist durch zahlreiche menschengemachte Schadstoffverbindungen verunreinigt, ob aus dem alltäglichen Gebrauch, unbeabsichtigt oder vorsätzlich in die Umwelt gelangt. Viele Umweltbiotechnologen erforschen „biologische“ Methoden zur Reinigung der Umwelt. Durch Ausbringen von Organismen, die einen Schadstoff abbauen können, ließe sich eine Verschmutzung tatsächlich auf sehr einfache, kostengünstige Weise reinigen.

Häufig haben natürlich vorkommende Mikroorganismen die Fähigkeit, vom Menschen erzeugte Schadstoffe abzubauen. So verfügt beispielsweise *Rhodococcus* über ein äußerst vielfältiges Repertoire an Stoffwechselwegen zum Abbau von Schadstoffen. Dazu gehören: kurz- und langkettige Alkane, aromatische Moleküle (sowohl halogenierte als auch nitrosubstituierte) sowie hetero- und polyzyklische aromatische Verbindungen wie Chinolon, Pyridin, Thiocarbamat, *s*-Triazin-Herbizide, 2-Mercaptoben-zothiazol (eingesetzt als Vulkanisationsbeschleuniger), Benzothiophen, Dibenzothiophen, MTBE (s. unten) und die verwandten Ethyl-*tert*-butylether (ETBE). Zunächst besitzt *Rhodococcus* verschiedene Enzyme, die toxische Verbindungen abbauen, etwa Cytochrom-P450-Enzyme. Diese wirken sehr effizient und vielseitig in Oxidationsreaktionen und katalysieren viele Reaktionen, darunter die Epoxidierung (Abb. 12.7). Weitere Enzyme, die entscheidende Abbauschritte katalysieren, sind unter anderem Monooxygenasen und Dioxygenasen; diese spielen eine Rolle beim Abbau aromatischer Verbindungen (s. Kap. 13).

Darüber hinaus können mehrere Stämme von *Rhodococcus* in Lösungsmitteln wie Ethanol, Butanol, Dodecan und Toluol überleben, die viele andere Bakterien abtöten. Die Erdöl-abbauenden Stämme haften sogar an Öltröpfchen! *Rhodococcus*-Spezies finden sich in Umwelten aller Art, etwa in Atomüllsedimenten, in tropischen und arktischen Böden, an Orten in Europa, Japan und den Vereinigten Staaten. Aus genetischer Sicht hat *Rhodococcus* zudem einzigartige Eigenschaften, die für den biologischen Abbau von Vorteil sind. Das Genom des *Rhodococcus*-Stammes RHA1 umfasst 9,7 Mb DNA, darunter ein Chromosom und drei große lineare Plasmide. Die Plasmide könnten eine entscheidende Rolle spielen, weil sie für den Gentransfer und Rekombinationsereignisse von Bedeutung sind. Die Gene für die katabolen Enzyme finden sich oft in Form von Clustern, flankiert von *inverted repeats* (invertierten Sequenzwiederholungen); das legt nahe, dass sie durch Rekombination erworben und von Stamm zu Stamm

12.7 Durch *Rhodococcus* katalysierte Oxygenasereaktionen

Rhodococcus kann verschiedene Reaktionen katalysieren, darunter die Epoxidierung durch Cytochrom-P450-Enzyme (a), die Hydroxylierung von Alkylgruppen durch Alkan-Monoxygenasen (b) und die Sulfoxidation von Sulfid zu Sulfoxid (c).



weitergegeben werden. Durch einen solchen horizontalen Gentransfer können diese katabolen Regionen in andere Bakterien wie *Pseudomonas* und *Mycobacterium* gelangen. In Kapitel 13 über Stoffwechsel-Engineering werden einige Plasmide beschrieben, die Schadstoff-abbauende Enzyme codieren.

Verschiedene Schadstoffe werden auf unterschiedliche Weise abgebaut. In manchen Fällen kann ein einzelner natürlich vorkommender Organismus einen Schadstoff vollständig abbauen. Für den vollständigen Abbau anderer Schadstoffe ist mehr als ein Bakterientyp notwendig. Manche Schadstoffe werden sehr langsam abgebaut. Schwermetalle können nicht chemisch abgebaut werden und werfen daher größere Probleme auf als organische Moleküle. Die meisten Umweltbiotechnologen suchen nach Mikroorganismen, die das Schwermetall in eine feste Phase absondern. Durch Umwandlung solcher Schwermetalle wie Uran aus einer wässrigen Phase in eine feste Phase lassen sich zum Beispiel Trinkwasservorräte reinigen. So können bestimmte anaerobe Mikroorganismen Uran (VI) zu Uran (IV) reduzieren, indem sie dieses Metall als terminalen Elektronenakzeptor verwenden. Dadurch wird Uran von einer flüssigen in eine unlösliche Form umgewandelt. Im Rahmen einer Studie mischte man an einem mit Uran kontaminierten Standort (Old Rifle, Colorado, USA) Acetat ins Grundwasser. Acetat wirkt als Elektronendonator und regt die Metall-reduzierenden Bakterien dazu an, Uran in die feste Phase umzuwandeln. Innerhalb von 50 Tagen konnte auf diese Weise bei einigen kontaminierten Quellen der Urangelalt auf unter das gesetzlich vorgeschriebene Maß verringert werden. Trotz dieser recht vielversprechenden Ergeb-

nisse verflüchtigte sich das Acetat mit der Zeit, und die Konzentration an löslichem Uran stieg wieder an. Daher werden vor allem Forschungen notwendig sein, um Möglichkeiten zu finden, wie man Uran dauerhaft aus dem Grundwasser beseitigen kann.

Als weiterer hartnäckiger Schadstoff kann **Methyl-tert-butylether (MTBE)** das Grundwasser belasten. Es dient als Antiklopfmittel in Benzin. Von einer Verseuchung des Grundwassers mit MTBE wurde schon in vielen Fällen berichtet. Eine natürliche Methode zur Reinigung solcher Verschmutzungen wäre also von großem praktischen Nutzen. In den USA wurde MTBE von der Umweltschutzbehörde (United States Environmental Protection Agency) als potenzielles Cancerogen eingestuft; daher darf Trinkwasser maximal 20 bis 40 $\mu\text{g/L}$ enthalten. An einer kontaminierten Stelle im Bundesstaat South Carolina waren große Mengen MTBE-haltiges Benzin aus einem unterirdischen Speichertank einer Tankstelle ausgetreten und in einen Drainagegraben gelangt. Die MTBE-Konzentration im Wasser war gering, und in der zwei Meter breiten Lücke zwischen der anaeroben und aeroben Zone wurde MTBE von natürlich vorkommenden Mikroorganismen abgebaut. Daraufhin durchgeführte Untersuchungen bestätigten, dass Bakterien wie *Methylobium petroleophilum* PM1 MTBE in Übergangsbereichen von anaeroben (anoxischen) zu aeroben (oxischen) Bedingungen abbauen können. Als man in South Carolina in die anaeroben Bereiche des Einzugsgebietes der MTBE-Kontamination eine Verbindung ausbrachte, die Sauerstoff freisetzte, verringerte sich dort der Gehalt an MTBE von 20 mg/L auf 2 mg/L. Dies zeigt, dass eine **Biostimulation** eine gute Methode zur

Reinigung von Kontaminationen sein könnte. Unter Biostimulation versteht man das Ausbringen von Nährstoffen, Oxidantien oder Elektronendonatoren in die Umwelt, um dadurch natürlich vorkommende Mikroorganismen zum Abbau eines Schadstoffs anzuregen. In anderen mit MTBE kontaminierten Gebieten muss man vielleicht eine **Bioaugmentation** durchführen, also die spezifischen Mikroorganismen plus ihre Energiequelle ausbringen. Dabei kann es sich um natürlich vorkommende Mikroorganismen handeln, um mehrere verschiedene Organismen gemeinsam oder auch um genetisch modifizierte Organismen (s. Kap. 13).

Bei der biologischen Sanierung oder Bioremediation werden Organismen wie Bakterien dazu verwendet, mit Schadstoffen belastete Gebiete zu reinigen.

Verschiedene Schadstoffe werden auf unterschiedliche Weise abgebaut. Manchmal kann ein einziger natürlich vorkommender Organismus einen Schadstoff vollständig abbauen. Für den kompletten Abbau anderer Schadstoffe sind bisweilen mehrere verschiedene Bakterien erforderlich.

Unter Biostimulation versteht man das Ausbringen von Nährstoffen, Oxidantien oder Elektronendonatoren in die Umwelt, um natürlich vorkommende Mikroorganismen zum Abbau eines Schadstoffs anzuregen.

Bei einer Bioaugmentation werden nicht nur spezifische Mikroorganismen, sondern auch deren Energiequellen zur Reinigung eines schadstoffbelasteten Gebiets ausgebracht.

► Weiterführende Literatur

- Bamford DH, Grimes JM, Stuart DI (2005) What does structure tell us about virus evolution? *Curr Opin Struct Biol* 15: 655–663
- Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Cowan D, Meyer Q, Stafford W, Muyanga S, Cameron R, Wittwer P (2005) Metagenomics gene discovery: Past, present and future. *Trends Biotechnol* 23: 321–329
- Daniel R (2004) The soil metagenome – a rich source for the discovery of novel natural products. *Curr Opin Biotechnol* 15: 199–204
- Fu X, Huang Y, Deng S, Zhou R, Yang G, Ni X, Li W, Shi S (2005) Construction of a SSH library of *Aegiceras corniculatum* under salt stress and expression analysis of four transcripts. *Plant Sci* 169: 147–154
- Galperin MY, Baker AJM (2004) Environmental biotechnology. From biofouling to bioremediation: The good, the bad and the vague. *Curr Opin Biotechnol* 15: 167–169
- Galvão TC, Mohn WW, de Lorenzo V (2005) Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends Biotechnol* 23: 497–506
- Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, Cianciotto NP, Liles MR, Rondon MR, Clardy J, Goodman RM, Handelsman J (2002) Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* 68: 4301–4306
- Handelsman J (2004) Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 669–685
- Kröger S, Law RJ (2005) Sensing the sea. *Trends Biotechnol* 23: 250–256
- Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CCR (2005) Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. *Curr Opin Biotechnol* 16: 282–290
- Lloyd JR, Renshaw JC (2005) Bioremediation of radioactive waste: Radionuclide-microbe interactions in laboratory and field-scale studies. *Curr Opin Biotechnol* 16: 254–260
- McDonald IR, Radajewski S, Murrell JC (2005) Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. *Org Geochem* 36: 779–787
- Parales RE, Haddock JD (2004) Biocatalytic degradation of pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 15: 374–379
- Rowe-Magnus DA, Mazel D (1999) Resistance gene capture. *Curr Opin Microbiol* 2: 483–488
- Schloss PD, Handelsman J (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* 14: 303–310
- Scow KM, Hicks KA (2005) Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Curr Opin Biotechnol* 16: 246–253
- Streit WR, Daniel R, Jaeger K-E (2004) Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* 15: 285–290
- van Beilen JB, Funhoff EG (2005) Expanding the alkane oxygenase toolbox. New enzymes and applications. *Curr Opin Biotechnol* 16: 308–314
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Badentillson H, Pfannkoch C, Rogers Y-H, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74
- Whiteley AS, Manefield M, Lueders T (2006) Unlocking the “microbial black box” using RNA-based stable isotope probing technologies. *Curr Opin Biotechnol* 17: 67–71
- Wiatrowski HA, Barkay T (2005) Monitoring of microbial metal transformations in the environment. *Curr Opin Biotechnol* 16: 261–268
- Zylstra G, Kukor JJ (2005) What is environmental biotechnology? *Curr Opin Biotechnol* 16: 243–245

Stoffwechsel-Engineering

Einführung

Ethanol, Elefanten und Stoffwechsel-Engineering

Abbau von Stärke

Abbau von Cellulose

Eis-bildende Bakterien und Frost

Abbau aromatischer Ringverbindungen

Indigo und verwandte natürliche Farbstoffe

Der Toluol/Xylol-Abbauweg

Abspaltung von Halogen-, Nitro- und Sulfonatgruppen

Bioraffinerie von fossilen Brennstoffen

Biosynthese mittelgroßer Moleküle

Synthese und Modifikation von Sterinen

Biosynthese von β -Lactam-Antibiotika

Polyketide und Polyketidantibiotika

Auch biosynthetische Kunststoffe sind biologisch abbaubar

Weiterführende Literatur

Einführung

Aus genetischer Sicht kann die Produktion eines kleinen Moleküls wie Ethanol durchaus komplizierter sein als die Produktion eines Proteins wie Somatotropin. Proteine sind zwar komplexe Makromoleküle, werden aber durch einzelne Gene codiert, während kleine Moleküle über biochemische Synthesewege hergestellt werden müssen; diese erfordern mehrere Schritte, die jeweils von einem eigenen Enzym katalysiert werden. Somit sind daran mehrere Gene beteiligt, inklusive ihrer Regulationssysteme. Beim **Stoffwechsel-Engineering** (engl. *pathway engineering*, auch *metabolic engineering* genannt) geht es darum, mithilfe der Gene eines oder mehrerer Organismen neue oder verbesserte biochemische Synthesewege zusammenzustellen. Bislang zielten die meisten Bemühungen weniger darauf ab, völlig neue Reaktionswege zu kreieren; vielmehr versuchte man, existierende Wege zu modifizieren oder zu verbessern. Zweifellos werden im Laufe der nächsten Jahre aber auch völlig neue Synthesewege auftauchen.

Das Stoffwechsel-Engineering kann sowohl auf abbauende Reaktionswege als auch auf Biosynthesewege angewandt werden. Speziell modifizierte Bakterien können dazu dienen, durch einen als **biologische Sanierung** oder **Bioremediation** bezeichneten Vorgang Abfallstoffe aus der Landwirtschaft, Schadstoffe wie Industriechemikalien, aber auch Herbizide (Unkrautvernichtungsmittel) und so weiter abzubauen.

Außerdem werden Mikroorganismen zur Herstellung verschiedener Produkte wie Alkohole, Lösungsmittel, Lebensmittelzusatzstoffe, Farbstoffe und Antibiotika verwendet. Am effizientesten sind Reaktionswege, durch die ansonsten nutzlose Stoffe in nützliche Produkte umgewandelt werden. Als Beispiel hierfür soll gleich zu Beginn die alkoholische Gärung betrachtet werden. Dieser Prozess wurde schon lange vor Beginn der modernen Wissenschaft entwickelt und gehört wahrscheinlich zu den frühesten Ausflügen des Menschen in die Biotechnologie.

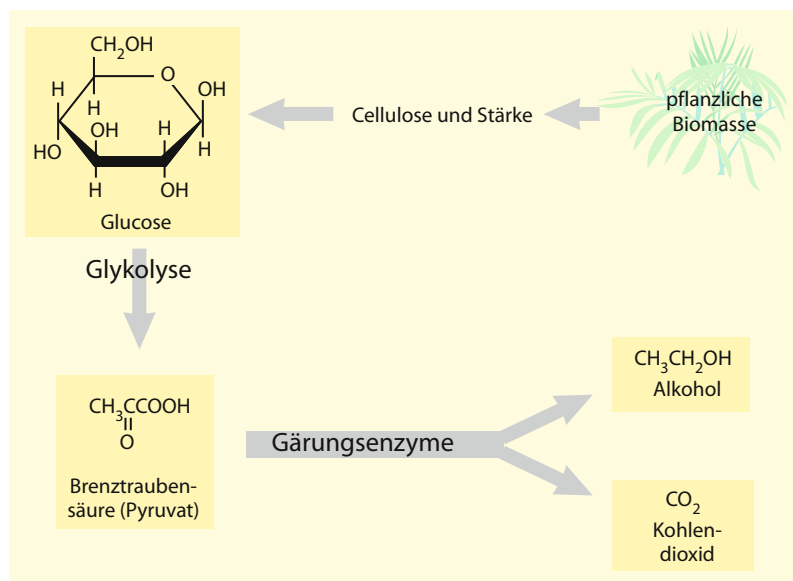
Mit gentechnischen Mitteln kann man neue oder effizientere Stoffwechselwege erzeugen. Auf diese Weise können sowohl Abbauwege als auch Biosynthesewege modifiziert werden.

Ethanol, Elefanten und Stoffwechsel-Engineering

Der Mensch war nicht das erste Lebewesen, das Alkohol zu schätzen lernte. Auch Elefanten, Affen und andere Wildtiere verzehren gezielt Früchte, die Alkohol enthalten, weil schon der natürliche Gärungsprozess eingesetzt hat. Manchmal laufen Elefanten in Afrika und Asien nach dem Verzehr solcher vergorenen Früchte sogar Amok. Gelegentlich verwüsten Elefan-

13.1 Vom Zucker zum Alkohol

Pflanzenmaterial enthält Polysaccharide wie Stärke und Cellulose. Enzyme bauen die Stärke ab und setzen dadurch die Glucosemoleküle frei. Durch die Glykolyse wird diese Glucose in Brenztraubensäure (Pyruvat) umgewandelt, die zu Alkohol und Kohlendioxid vergoren wird.



ten selbst Dörfer und zerstören Häuser, um an die vergorenen Getränke der Menschen zu gelangen! In den Regionen Spaniens, in denen Sherry hergestellt wird, gibt es sogar eine Taufliiegenart der Gattung *Drosophila*, die Sherry zu ihrer einzigen Nahrungsquelle gemacht hat. Diese Insekten schwirren ihr ganzes Leben lang in den Höhlen umher, in denen der Sherry produziert wird. Die frühesten kulturell überlieferten Nachweise des Alkoholkonsums beim Menschen datieren auf etwa 5000 v. Chr. zurück. Gelbliche Rückstände in neusteinzeitlichen Töpferwaren aus dem Iran erwiesen sich als Wein.

Alkohol entsteht aus Zucker (Abb. 13.1). Zucker sind Bestandteile der Kohlenhydrate, die den größten Teil pflanzlichen Materials ausmachen. Daher kann man im Prinzip aus fast jedem Pflanzenmaterial Alkohol herstellen. Die Zucker aus Getreide oder Trauben werden mithilfe von Hefe vergoren. Dadurch entsteht eine alkoholische Flüssigkeit – die Grundlage von Bier beziehungsweise Wein. Durch Destillierung entstehen dann höherprozentige Spirituosen wie Whisky oder Wodka. Als einzige Ausnahme wird neben Hefe das Bakterium *Zymomonas* verwendet. Dieses fermentiert den Saft von Agavenpflanzen zu dem alkoholischen Getränk Pulque. Daraus wird durch Destillierung Tequila hergestellt.

Auf dem Gebiet alkoholischer Getränke besteht wenig Bedarf für Gentechnik. Man kann Alkohol jedoch mit Benzin zu „Gasohol“ vermischen, das in den meisten Verbrennungsmotoren recht gut funktioniert. Durch die Umwandlung von Biomasseabfällen in Kraftstoffalkohol würde man daher nicht nur riesige Mengen von Abfallstoffen beseitigen, sondern zudem den Benzinverbrauch verringern. Würden die Vereinigten Staaten die 100 Millionen Tonnen Altpapier, die sie jährlich produzieren, in für Kraftstoffe nutzbaren Alkohol verwandeln, könnte der Benzinverbrauch um 15 % gesenkt werden. Auch aus Mais kann man Alkohol herstellen. Das ist wirtschaftlich sehr interessant, weil beispielsweise in Ländern wie den USA auf riesigen Flächen Mais angebaut wird und dabei große Überschüsse erzeugt werden. Im Gegensatz zu der Holzmasse für Papier wächst Mais innerhalb eines Jahres nach.

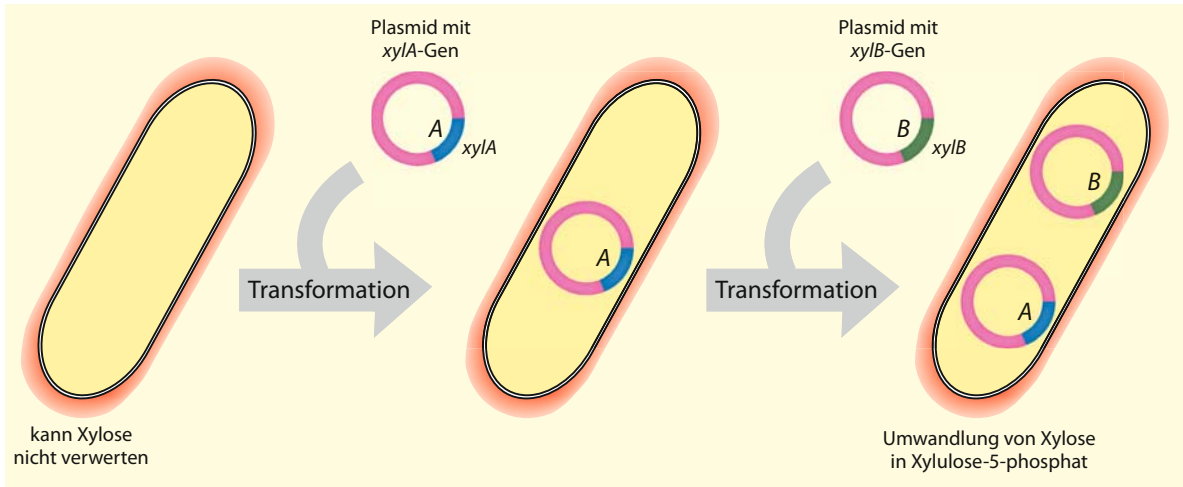
Der Vorteil bei der Verwendung von *Zymomonas* und Hefe besteht darin, dass sie bei der Gärung nur Alkohol produzieren, während die meisten Mikroorganismen ein Gemisch aus Fermentationsprodukten erzeugen. So produziert beispielsweise *Escherichia coli* ein Gemisch aus Ethanol, Acetat, Succinat, Lactat und Formiat. Zwar sind viele Fermentationsprodukte potenziell nutzbar, ihre Reinigung erweist sich jedoch

als kostspieliger Nachteil. Bei *Zymomonas* besteht das Problem, dass dieses Bakterium nur von Glucose lebt und keine Enzyme für den Abbau anderer Zucker besitzt – ganz zu schweigen von solchen, die zum Abbau von Kohlenhydratpolymeren wie Stärke und Cellulose benötigt werden. Hefe ist in ihren Anforderungen fast genauso beschränkt. *Zymomonas* wächst schneller als Hefe und produziert auch schneller Alkohol. Andererseits sind Hefen widerstandsfähiger gegenüber Alkohol und können daher höhere Alkoholkonzentrationen im Wachstumsmedium anreichern, bevor ihr Wachstum zum Stillstand kommt.

Mithilfe der Gentechnik werden verbesserte Stämme von Hefe und *Zymomonas* hergestellt, die ein größeres Spektrum an Zuckern nutzen können. Zusätzlich kann man Gene für Enzyme einbauen, die Stärke, Cellulose oder andere pflanzliche Polysaccharide abbauen können (s. unten). Schließlich kann man diese Organismen auch so modifizieren, dass sie eine höhere Resistenz gegenüber Alkohol oder andere Eigenschaften aufweisen, die unter industriellen Bedingungen ein optimales Wachstum und eine optimale Produktion gewährleisten.

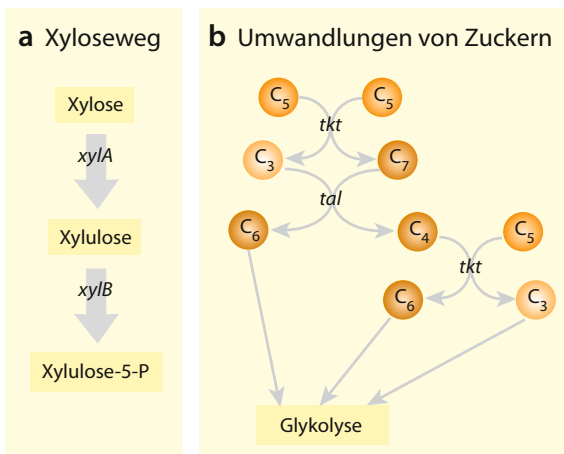
Xylose ist ein Zucker mit fünf Kohlenstoffatomen und ein wichtiger Bestandteil verschiedener Polysaccharide (Xylane) aus pflanzlichen Zellwänden (s. weiter unten). Für einen potenziellen biologischen Abbau stehen riesige Mengen an pflanzlichem Abfallmaterial zur Verfügung. Durch den Abbau der Polysaccharidpolymere würden große Mengen Xylose freigesetzt. Folglich wäre es von Vorteil, *Zymomonas*-Stämme zu entwickeln, die effizient Xylose zu Alkohol vergären. Dies ist in zwei Stufen erfolgt. Zunächst musste man die Gene für die Verstoffwechslung von Xylose selbst einführen, da *Zymomonas* diesen Zucker von Natur aus nicht nutzt. Die Gene *xylA* und *xylB* codieren für die Enzyme Xylose-Isomerase und Xylulose-Kinase, die Xylose zu Xylulose beziehungsweise Xylulose anschließend zu Xylulose-5-phosphat umwandeln. Diese beiden Gene wurden in einen Shuttle-Vektor überführt, der Replikationsursprünge sowohl für *E. coli* (in dem die genetische Modifikation erfolgte) als auch für *Zymomonas* trägt (Abb. 13.2).

Der Stamm, der lediglich die zusätzlichen Gene *xylA* und *xylB* enthielt, zeigte nur ein schwaches Wachstum, da er neben Xylulose-5-phosphat auch noch die Phosphate anderer Pentosezucker anreichte, beispielsweise Ribose-5-phosphat. Daher fügte man dem Plasmid noch die Gene für Transketolase (*tktA*) und Transaldolase (*tal*) unter Kontrolle eines separaten Promotors hinzu. Durch diese beiden Enzyme werden Pentosephosphate wieder in Hexo-



13.2 Stoffwechsel-Engineering zur Nutzung von Xylose – Gene

Xylose muss vor der Umwandlung in Alkohol über spezielle Reaktionen abgebaut werden. Für diesen Abbau der Xylose sind die beiden Gene *xylA* und *xylB* erforderlich. Das XylA-Protein wandelt Xylose in Xylulose um, XylB phosphoryliert diese zu Xylulose-5-phosphat. Die beiden Gene werden mithilfe von Shuttle-Plasmiden in Bakterien wie *Zymomonas* transformiert.



sephosphate zurückverwandelt. Damit erhielt man einen *Zymomonas*-Stamm, der Xylose zunächst in Xylulose-5-phosphat verwandeln konnte und dann weiter zu Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Diese zentralen Zwischenprodukte konnten schließlich effizient zu Ethanol vergoren werden (Abb. 13.3).

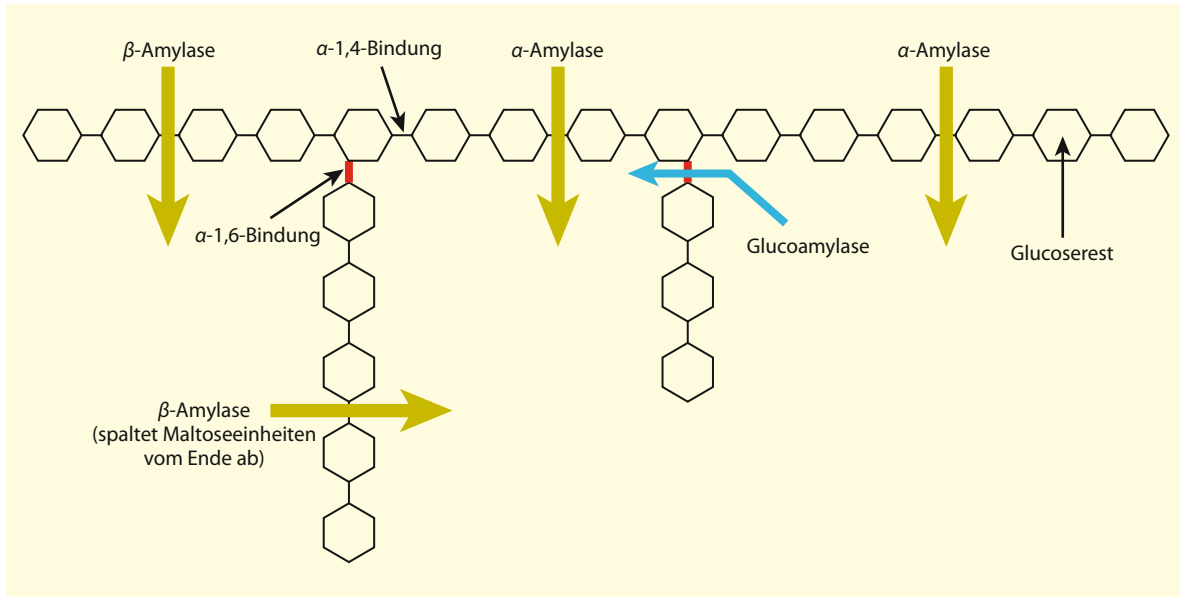
Die Umwandlung von Zuckern in Alkohole zählt zu den ältesten Industrieprozessen. Durch Stoffwechsel-Engineering könnte es gelingen, pflanzliche Abfallstoffe einschließlich Altpapier in Kraftstoff-alkohol umzuwandeln.

13.3 Stoffwechsel-Engineering zur Nutzung von Xylose – Reaktionen

a Xylose wird mithilfe der Gene *xylA* und *xylB* in Xylulose-5-phosphat umgewandelt. **b** Transketolase (*tktA*) wandelt zwei C_5 -Zuckermoleküle (mit fünf Kohlenstoffatomen) in einen C_3 - und einen C_7 -Zucker um (mit drei beziehungsweise sieben Kohlenstoffatomen). Transaldolase (*tal*) verwandelt diese Produkte anschließend in einen C_4 -Zucker und Fructose-6-phosphat, einen Zucker mit sechs Kohlenstoffatomen. Fructose-6-P wird durch die Glykolyse zu Ethanol abgebaut. Der C_4 -Zucker und ein weiteres Pentose-5-P (C_5) werden von Transketolase in einen zweiten C_6 -Zucker und einen C_3 -Zucker umgewandelt. Diese gehen dann beide in die Glykolyse ein und liefern Ethanol.

Abbau von Stärke

Das Speicherpolysaccharid **Stärke** kommt in vielen Pflanzen vor. Es handelt sich um ein Polymer aus Glucoseeinheiten, die über α -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind. Genauer besteht Stärke aus einem Gemisch aus einem linearen Polymer – **Amylose** – und einem verzweigten Polymer – **Amylopektin**. Die Verzweigungen von Amylopektin gehen auf α -1,6-glykosidische Bindungen zurück, die unge-



13.4 Enzymatischer Abbau von Stärke durch Amylasen

Stärke besteht aus langen Ketten aus Glucoseresten, von denen weitere Glucoseketten abzweigen. In der Hauptkette sind die Glucoseeinheiten durch α -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. Die Seitenkette geht von einer α -1,6-glykosidischen Bindung aus. Amylase spaltet zwischen den Glucoseresten. α -Amylase spaltet die α -1,4-glykosidische Bindung in der Hauptkette, β -Amylase hingegen spaltet vom Ende der Ketten jeweils Einheiten aus zwei Glucoseresten (Maltose) ab. Glucoamylase spaltet die α -1,6-glykosidische Bindung und damit die Seitenkette von der Hauptkette ab.

für alle 20 Glucosereste der Polymerkette auftreten. Die Kettenlänge schwankt zwischen 100 und 500 000 Glucoseresten bei Amylose und bis zu 40 000 bei Amylopektin. Auch der Anteil linearer und verzweigter Polymere variiert je nach Herkunft der Stärke. **Glykogen** ist ein Speicherpolysaccharid bei Tieren. Es entspricht im Wesentlichen Stärke, mit einem hohen Anteil an verzweigten Polymeren.

Stärke wird in der Lebensmittel- und Brauindustrie verwendet und überwiegend anstelle von Mikroorganismen mithilfe der gereinigten Enzyme α -Amylase und Glucoamylase in Glucose umgewandelt (Abb. 13.4). Die α -Amylase spaltet die linearen Abschnitte der Stärkekettens an zufälligen Stellen, Glucoamylase wird hingegen zur Spaltung der Verzweigungen benötigt. Die Glucose kann anschließend mit dem Enzym Glucose-Isomerase zu Fructose oder durch mikrobielle Fermentation in Alkohol umgewandelt werden. Aufgrund der Größe der Lebensmittel- und Brauindustrie belaufen sich die Kosten für α -Amylase und Glucoamylase plus Glucose-Isomerase auf mehr als 25 % der Kosten aller industriell genutzten Enzyme. Diese Enzyme

werden von vielen Mikroorganismen synthetisiert. Für die industrielle Nutzung wird jedoch gewöhnlich α -Amylase aus dem Bakterium *Bacillus amyloliquefaciens* und Glucoamylase aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* verwendet.

Durch gentechnische Modifikationen ließe sich der Vorgang des Stärkeabbaus auf mehrere Arten verbessern. Man könnte zum Beispiel rekombinante Organismen erzeugen, die mehr Enzym produzieren. Auch die Enzyme selbst könnten auf eine höhere Hitzestabilität oder Reaktionsgeschwindigkeit modifiziert werden, wie in Kapitel 11 diskutiert. Alternativ sollte es möglich sein, Mikroorganismen zu konstruieren, welche die Hydrolyse der Stärke teilweise oder vollständig ausführen und zudem die dabei entstehende Glucose in Alkohol umwandeln.

Ein Gen für Glucoamylase hat man aus *Aspergillus niger* kloniert und in einen geeigneten Hefestamm eingebaut. Man stellte das Gen unter die Kontrolle eines starken Hefepromotors und übertrug es mit einem Hefepiasmid. Die gentechnisch veränderte Hefe konnte löslich gemachte Stärke abbauen und die dabei entstehende Glucose zu Alkohol ver-

gären. Irgendwann könnte es vielleicht möglich sein, Hefestämme zu erzeugen, die genügende Mengen α -Amylase exprimieren (und sezernieren), um rohe Stärke vollständig in Ethanol umzuwandeln.

Stärke ist ein in großen Mengen verfügbares Rohmaterial. Mit größeren Enzymmengen und stabilen Enzymen könnte man den Abbau von Stärke in Zucker deutlich verbessern.

Abbau von Cellulose

Pflanzliche Zellwände enthalten ein Gemisch aus Polysacchariden mit hoher Molekülmasse. Die Hauptbestandteile bilden **Cellulose**, **Hemicellulose** und **Lignin**. Das Strukturpolymer Cellulose besteht aus β -1,4-glykosidisch miteinander verknüpften Glucoseeinheiten. Damit steht Cellulose im Gegensatz zu den Speichermaterialien Stärke und Glykogen, die zwar ebenfalls ausschließlich aus Glucoseresten aufgebaut sind, allerdings α -1,4-glykosidische Verknüpfungen aufweisen. Hemicellulose ist ein Gemisch aus kürzeren Polymeren, die aus verschiedenen Zuckern bestehen, neben Glucose vor allem Mannose, Galactose, Xylose und Arabinose. Lignin unterscheidet sich von den anderen Polymeren vor allem in zwei grundlegenden Aspekten. Erstens ist es kein Polysaccharid, sondern besteht aus aromatischen Resten (vor allem Phenylpropanringen). Zweitens ist Lignin zu einem unlöslichen dreidimensionalen Netzwerk quervernetzt.

In Form landwirtschaftlicher Abfälle sind riesige Mengen von Material verfügbar, das hauptsächlich von pflanzlichen Zellwänden stammt. In der Natur bauen Pilze und Bakterien dieses Material langsam ab. Es könnte sehr vorteilhaft sein, die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Abbauege durch entsprechende Modifikationen zu erhöhen. Aufgrund seiner einfachen Zusammensetzung und regelmäßigen Struktur ist Cellulose am leichtesten abzubauen, Lignin hingegen am schwersten. Papier macht (zusammen mit Karton und ähnlichen Materialien) den größten Anteil am Müll von Industrienationen aus. Da Papier fast ausschließlich aus Cellulose besteht, könnte auch dieses potenziell von Cellulose-abbauenden Mikroorganismen in Glucose umgewandelt werden.

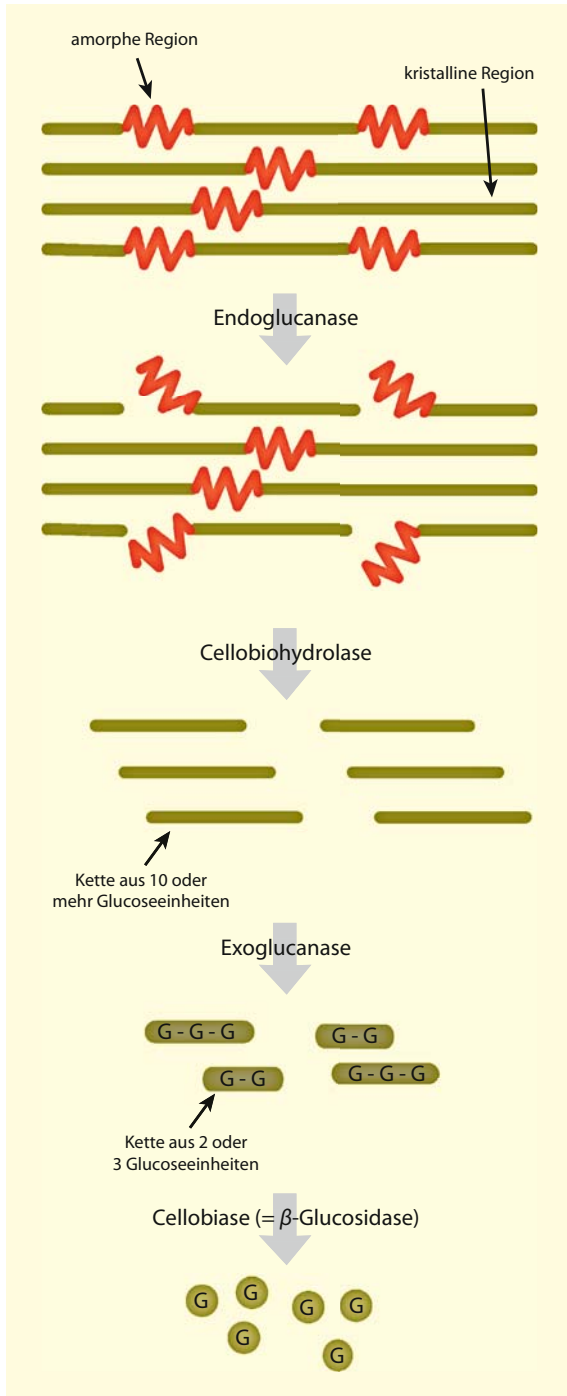
Die Polymerketten von Cellulose sind in einer kristallinen Anordnung dicht aneinander gepackt, ab

und zu unterbrochen von locker gepackten, nicht-kristallinen Zonen (Abb. 13.5). Die Herausforderung besteht darin, die Cellulose zu Glucose abzubauen, die dann in Alkohol und andere Produkte umgewandelt werden kann. Der Abbau der Cellulose erfolgt in mehreren Schritten (Abb. 13.5), die jeweils von einem anderen Enzym katalysiert werden:

1. Endoglucanase zerschneidet die Polymerketten in der Mitte. Dieses Enzym kann ausschließlich die Polymerketten in den locker gepackten „amorphen“ Zonen angreifen.
2. Cellobiohydrolase spaltet von den durch Endoglucanase erzeugten freien Enden Abschnitte aus zehn oder mehr Glucoseeinheiten ab.
3. Exoglucanase spaltet von den exponierten Enden Abschnitte aus zwei oder drei Glucoseeinheiten ab, die als Cellobiose beziehungsweise Cellotriose bezeichnet werden.
4. β -Glucosidase (auch unter der Bezeichnung Cellobiase bekannt) wandelt Cellobiose und Cellotriose in Glucose um.

Die Gene für jedes dieser vier Enzyme wurden von verschiedenen Mikroorganismen kloniert. Weil Cellulose für die Zelle zu groß ist, müssen die ersten drei Enzyme sezerniert werden und ihre Funktion außerhalb der Zelle erfüllen. Cellobiose und Cellotriose (beziehungsweise das β -1,4-glykosidisch verknüpfte Dimer und Trimer von Glucose) entstehen also außerhalb der Zelle aus Cellulose und können dann in die Zelle hineintransportiert werden. Dort erfolgt dann ihre endgültige Spaltung in die einzelnen Glucosemoleküle, die zu Alkohol vergoren werden können. Bisher konnte in vereinzelt Pilotprojekten der Abbau von Cellulose aus Altpapier in Glucose demonstriert werden. Dies geschah durch Zugabe einzelner Enzyme, die aus verschiedenen Quellen gereinigt wurden. Alternativ werden verschiedene Cellulose-abbauende Mikroorganismen verwendet, die jeweils nach hohen Mengen eines bestimmten Enzyms ausgewählt wurden. Für die Umwandlung der Glucose in Alkohol werden schließlich noch *Zymomonas* oder Hefe hinzugegeben.

Besonders effizient sind solche mehrstufigen Prozesse nicht, da das Problem der Effizienz bei jedem Schritt besteht. Beispielsweise wirkt Cellobiose als Feedback-Inhibitor des Celluloseabbaus, und ähnlich hemmt Glucose die Hydrolyse von Cellobiose. Daher ist es sehr wichtig, dass die Endprodukte des Celluloseabbaus so schnell wie möglich entfernt werden, damit ein kontinuierlicher Abbau der Ausgangs-



13.5 Celluloseabbau

Cellulose wird über mehrere enzymatische Reaktionen zu Glucosemolekülen abgebaut. Kennzeichnend für Cellulose sind amorphe und kristalline Bereiche. Endoglucanase spaltet nur in den amorphen Bereichen zu Beginn des Abbaus. Jedes der nachfolgenden Enzyme verkürzt die Glucosketten weiter. Weitere Einzelheiten siehe Text.

stoffe erfolgen kann. Der limitierende Schritt bei Cellulose-abbauenden Organismen in der Natur ist offenbar der Abbau der Cellobiose. Oft lassen sich diese Organismen verbessern, indem man das Gen für Cellobiase kloniert, der Kontrolle eines starken Promotors unterstellt und es wieder in den fraglichen Organismen überführt.

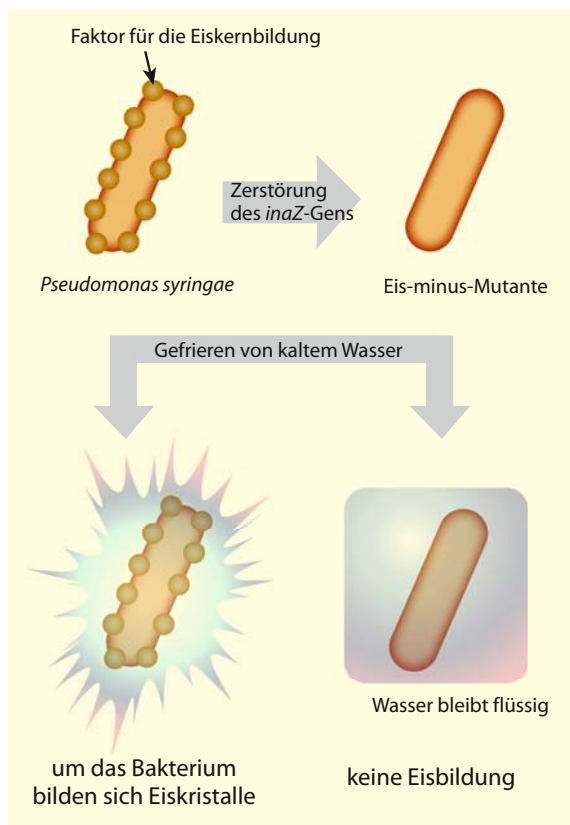
Insgesamt wäre es wünschenswert, einen vollständig rekombinanten Organismus zu haben, der Gene für alle vier Enzyme besitzt, diese in großen Mengen exprimiert und Cellulose eigenständig und effizient in Glucose umwandelt. In der Praxis kloniert und exprimiert man die Gene für den Celluloseabbau aus Bakterien und Pilzen aufgrund der einfachen Handhabung in *E. coli*. Die Gene für die einzelnen Schritte wurden inzwischen isoliert und charakterisiert. Irgendwann wird man vielleicht in einer Hefe oder in *Zymomonas* einen Celluloseabbauweg zusammenstellen, um Cellulose aus Abfällen in Alkohol umzuwandeln.

Im Vergleich zu Zuckern oder Stärke ist der Abbau von Cellulose relativ schwierig. Wenn es gelänge, in einem leicht zu kultivierenden Organismus einen effektiven Abbauweg zusammenzustellen, könnte dies von großem Nutzen sein, um Altpapier und ähnliche Materialien biologisch abzubauen.

Eis-bildende Bakterien und Frost

Der vielleicht einfachste „Reaktionsweg“ überhaupt ist die Umwandlung von Wasser zu Eis. Dieser Prozess kann durch Proteine „katalysiert“ werden, die als Faktoren für die **Eiskeimbildung** bekannt sind. In mikroskopischem Maßstab bildet Wasser bei der Verfestigung Eiskristalle. Diese benötigen jedoch einen mikroskopischen Kern oder „Keim“ (Kristallisationskeim), um den herum sie sich bilden können. Ohne Strukturen, welche die Bildung von Eiskeimen ermöglichen, unterkühlt Wasser bis auf -8°C ab, ohne sich zu verfestigen. Die Faktoren für die Eiskeimbildung sind also spezialisierte, meist in bestimmten Bakterien enthaltene Proteine, welche die Kerne für die Kristallisation bilden.

In der Landwirtschaft verursacht Frost alljährlich alleine in den USA Schäden in Milliardenhöhe. Diese Schäden sind nicht alleine auf die niedrigen Tem-



13.6 Die Zerstörung des *inaZ*-Gens verhindert die Bildung von Eiskernen

Zelloberflächenproteine von *Pseudomonas syringae* liefern einen Nucleationskeim für die Bildung von Eis. Das Gen *inaZ* codiert für ein Protein, das Eiskerne bildet. Bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt ermöglichen *P. syringae* vom Wildtyp die Bildung von Eiskristallen; dadurch wird jegliches pflanzliche Gewebe geschädigt, auf oder in dem sich die Bakterien befinden. Zerstört man jedoch das *inaZ*-Gen, so bilden sich durch diese *P. syringae*-Mutanten keine Eiskristalle, und das Wasser kann unterkühlen.

peraturen zurückzuführen. Wasser dehnt sich beim Gefrieren aus und schädigt so die Pflanzengewebe. Dass sich auf und in Pflanzen Eiskristalle bilden, ist überwiegend auf Proteine auf der Oberfläche von Bakterien zurückzuführen, vor allem *Pseudomonas syringae* und verwandte Arten, die auf Pflanzen leben. Die sich bildenden Eiskristalle schädigen die Pflanzengewebe und zerstören die Gefäße (Xylem und Phloem), die für den Transport von Wasser und Nährstoffen zuständig sind. Ohne die Eiskernbildenden Bakterien bildet sich kein Eis, das Wasser unterkühlt, und die Pflanze nimmt keinen Schaden.

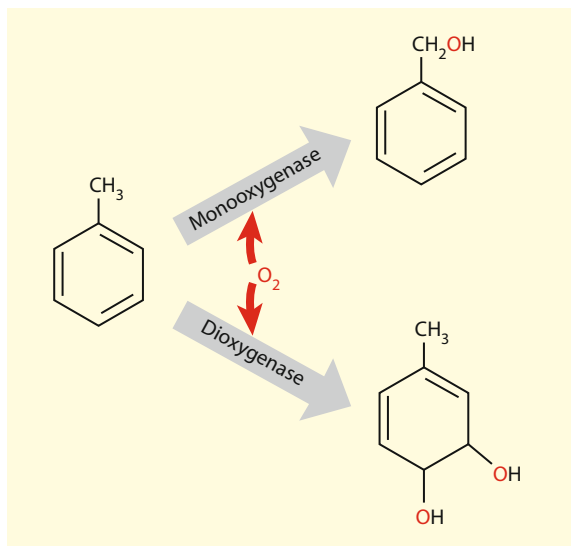
Das am besten bekannte Protein für die Eiskernbildung wird von dem *inaZ*-Gen von *Pseudomonas syringae* codiert. Wie die meisten Bakterien so fördert auch *E. coli* normalerweise nicht die Eisbildung. Wenn es jedoch ein kloniertes *inaZ*-Gen exprimiert, erlangt es die Fähigkeit Eiskerne zu bilden. Umgekehrt gilt jedoch auch: Wird das *inaZ*-Gen von *Pseudomonas syringae* geschädigt, geht diese Fähigkeit verloren (Abb. 13.6). Die Wildtypstämme („Eis-plus“) von *Pseudomonas syringae* können verdrängt werden, indem man die von Frostschäden bedrohten Nutzpflanzen mit „Eis-minus“-Mutanten besprüht. Selbst wenn die Temperatur anschließend unter den Gefrierpunkt fällt, bilden sich nur sehr wenige Eiskristalle, und die meisten Pflanzen werden nicht geschädigt.

Bakterien, die Proteine für die Eiskernbildung exprimieren, verursachen große Schäden an Nutzpflanzen. Durch Zerstörung des entsprechenden Gens kann man die Bildung von Eiskernen verhindern.

Abbau aromatischer Ringverbindungen

Viele Bakterien enthalten Plasmide, die den Abbau von Stoffen ermöglichen, welche die Bakterien ansonsten nicht nutzen könnten. Von besonderem Interesse sind Stoffwechselwege, die den Abbau von linearen und zyklischen Kohlenwasserstoffen und verwandten Verbindungen ermöglichen. Zahlreiche industriell genutzte Chemikalien, die sich von Erdöl ableiten, darunter auch verschiedene Pestizide und Herbizide, enthalten aromatische Ringe. Zusammen mit Ölresten oder -verunreinigungen sorgen diese häufig für schlimme Verschmutzungen. Daher kommt ihrem biologischen Abbau durch Bakterien eine erhebliche praktische Bedeutung zu. Chemische Verbindungen mit signifikanter biologischer Aktivität, die in der Umwelt eigentlich nicht vorkommen und die durch die menschliche Industrie dorthin gelangten, bezeichnet man bisweilen als **Xenobiotika**.

Viele Arten von *Pseudomonas* und verwandten Bakterien enthalten Plasmide, die ihnen die Fähigkeit verleihen, aromatische Kohlenwasserstoffe als Energiequelle zu nutzen. *Pseudomonas* ist im Boden und im Wasser weit verbreitet und lebt obligat aerob. Andere Pseudomonaden können auf einer Reihe



13.7 Einbau von Sauerstoff in Kohlenwasserstoffe

Monooxygenase und Dioxygenase bauen jeweils ein beziehungsweise zwei Sauerstoffatome in aromatische Verbindungen ein und bilden dadurch Hydroxylgruppen. In diesem Beispiel dient Toluol als Substrat.

verschiedener Substrate leben, beispielsweise auf Alkanen, mono- und polyzyklischen Aromaten, Heterozyklen, Phenolen, Terpenen, halogenierten Verbindungen und so fort. Viele ihrer Abbausysteme sind recht unspezifisch und können zahlreiche verwandte Substrate verarbeiten. Zu den ersten entdeckten Abbauwegen gehörten die für Toluol/Xylol und Naphthalin. Die Plasmide wurden ursprünglich nach ihren Substraten benannt (so baut z.B. das **TOL-Plasmid**, heute als pTOL bekannt, Toluol ab). Sie sind meist groß und in der Lage, sich selbst zwischen verwandten Bakterienstämmen zu übertragen.

Die meisten dieser Abbauewege beinhalten als entscheidenden Schritt den direkten Einbau von Sauerstoff durch **Oxygenasen** (Abb. 13.7). Monooxygenasen bauen ein einzelnes Sauerstoffatom ein; dadurch entsteht eine -OH-Gruppe. **Dioxygenasen** bilden durch den Einbau von zwei Sauerstoffatomen Dirole. Bei aromatischen Verbindungen greifen Monooxygenasen in der Regel die Seitenketten an, Dioxygenasen hingegen die aromatischen Ringe selbst.

Viele industriell genutzte Chemikalien enthalten wie auch Rohöl aromatische Ringe. Der Abbau solcher Ringe startet mit Oxygenasen; diese Enzyme bauen molekularen Sauerstoff ein.

Indigo und verwandte natürliche Farbstoffe

Enzyme, die aromatische Ringe angreifen, haben oft ein breites Substratspektrum. Häufig entfalten sie ihre Wirkung auch an verwandten Verbindungen, deren Ringe Schwefel-, Sauerstoff- oder Stickstoffatome enthalten, oder an Kohlenwasserstoffen. Das **Indol**-Ringsystem ähnelt Naphthalin und unterscheidet sich von diesem nur durch ein Stickstoffatom im Ring. Folglich greifen Naphthalin-Oxygenasen auch Indol und seine Derivate an (Abb. 13.8). Sie verwandeln Indol in sein Diol, das an der Luft spontan oxidiert und **Indigo** bildet, einen leuchtend blauen Farbstoff. Die meisten auf aromatische Ringe einwirkenden Dioxygenasen greifen Indol zumindest in gewissem Umfang an. Dies ermöglicht einen raschen Färbetest auf das Vorhandensein von Ring-Dioxygenasen und der aromatischen Reaktionswege, von denen sie ein Teil sind.

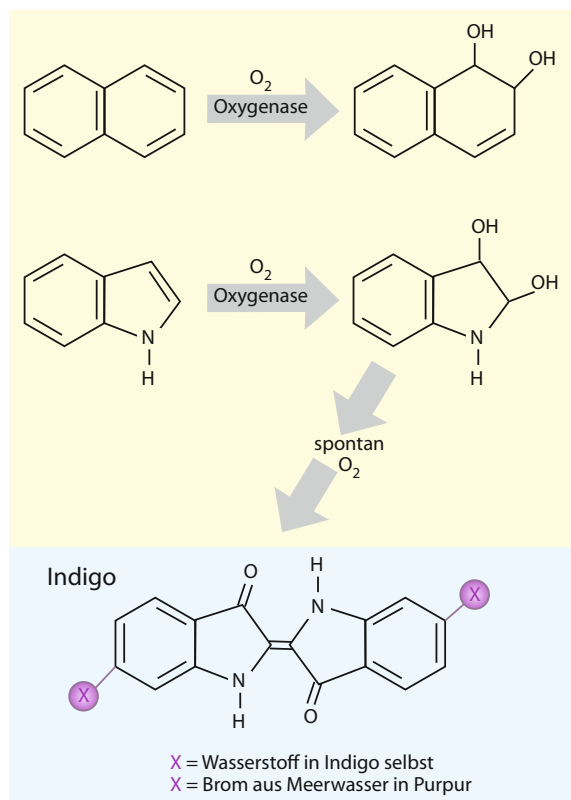
In der Bibel erwähnt Moses einen besonderen blauen Farbstoff, den die Israeliten tragen sollten: „blauen Purpur“. Bei diesem Farbstoff handelte es sich (wahrscheinlich) um eine 50:50-Mischung aus Purpur und Indigo. Das Geheimnis dieses heiligen Farbstoffs ging vor rund 1400 Jahren verloren, als die Phönizier, die ihn lieferten, durch die Invasion der Araber überrannt wurden. Der rötlich-violette Farbstoff Purpur wird aus der Meeresschnecke *Murex brandaris* (Herkuleskeule) gewonnen. Die verwandte Schneckenart *Murex trunculus* (Purpurschnecke) sezerniert ein Gemisch aus Purpur und Indigo – und somit vermutlich den verloren gegangenen „blauen Purpur“. Purpur ist mit Indigo sehr nahe verwandt (Abb. 13.8) und unterscheidet sich von diesem nur durch zwei von der Meeresschnecke aus dem Meerwasser extrahierte Bromatome am Indigoring. Beide Farbstoffe werden zunächst als farblose Vorstufen sezerniert, die sich nach Reaktion mit dem Sauerstoff der Luft blau (beziehungsweise purpurn) verfärben. Indigo selbst wird zum Färben von Wolle und Baumwolle verwendet. Bluejeans werden beispielsweise aus Indigo-gefärbter Baumwolle hergestellt.

Früher gewann man Indigo aus Pflanzen, heute wird es chemisch synthetisiert. Vor einiger Zeit entdeckte man mehr oder weniger durch Zufall genetisch veränderte Bakterien, die Indigo produzieren können. Die auf dem NAH-Plasmid enthaltenen *nah*-Gene codieren für das Enzym, das Naphthalin abbaut. Bei der Analyse des *nah*-Systems klonierte man Gene des NAH-Plasmids in *E. coli*, woraufhin

sich einige Bakterien blau färbten. Wie sich herausstellte, besaßen diese blauen Bakterien die Gene für **Naphthalin-Oxygenase**, das Enzym, welches den ersten Schritt beim Abbau von Naphthalin katalysiert. Wie bereits erwähnt, wirkt Naphthalin-Oxygenase auch sehr gut auf Indol und wandelt dieses in Indoxyl um. Durch den Sauerstoff der Luft wird das Indoxyl dann in Indigo verwandelt (s. Abb. 13.8). *E. coli* selbst liefert das Indol durch Abbau der Aminosäure Tryptophan. Gentechnisch modifizierte *E. coli* müssen zur Erzeugung von Indigo auf einem reichhaltigen Medium gezüchtet werden, das Proteinhydrolysat oder eine andere Quelle für Tryptophan

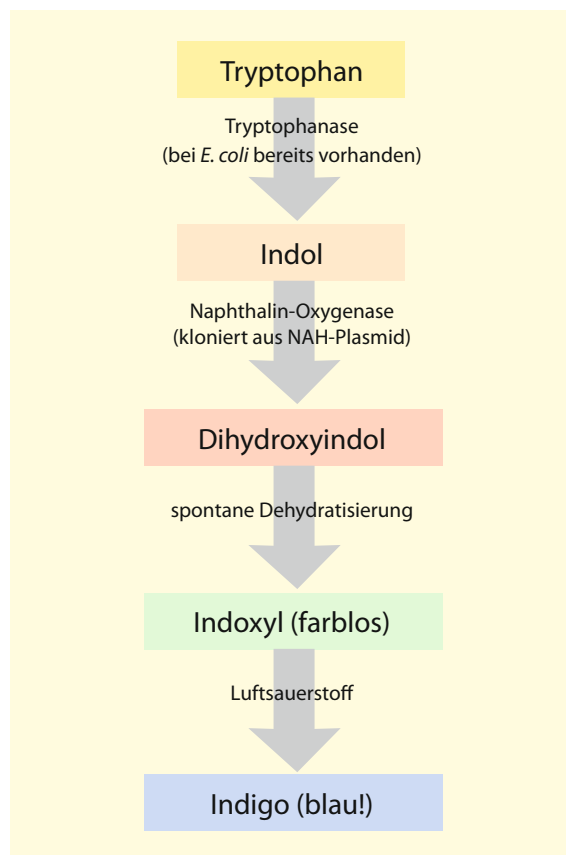
enthält (Abb. 13.9). Um einen solchen modifizierten Stoffwechselweg kommerziell nutzen zu können, müsste man die rekombinanten Bakterien mit dem Gen für Naphthalin-Oxygenase auf einem festen Träger in einen Bioreaktor einbringen. Am einen Ende müsste man Tryptophan zugeben, damit am anderen Ende Indigo herauskommt.

Indol wird von Naphthalin-Oxygenase oxidiert. Diese entscheidende Reaktion ermöglicht die Konstruktion eines Syntheseweges zur Herstellung des Farbstoffes Indigo aus der Aminosäure Tryptophan.



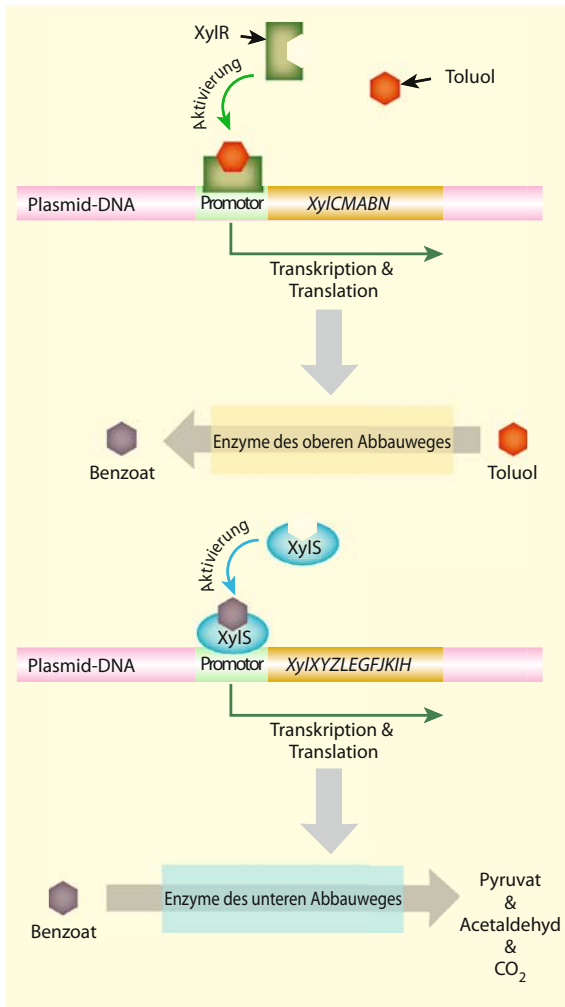
13.8 Ähnliche Reaktionen von Naphthalin und Indol

Wenn Naphthalin (oben) von einer Oxygenase angegriffen wird, entstehen zwei Hydroxylgruppen, und es bildet sich das Diol. Die gleiche Oxygenase greift auch den Indolring an, der Naphthalin sehr ähnlich ist. Das Indoxyl oxidiert spontan zu dem blauen Farbstoff Indigo. An das Indigo-Ringsystem können an den mit X gekennzeichneten Stellen verschiedene Gruppen gekoppelt sein. Handelt es sich bei X um Wasserstoff, so liegt das Indigomolekül selbst vor; handelt es sich bei X um Brom, dann liegt ein Molekül des Farbstoffs Purpur vor.



13.9 Gentechnisch modifizierter Weg der Indigosynthese

E. coli kann so modifiziert werden, dass es durch Expression von Naphthalin-Oxygenase aus dem NAH-Plasmid Indigo produziert. Zunächst wandelt *E. coli* Tryptophan mittels Tryptophanase in Indol um. Danach wird Indol durch die klonierte Oxygenase in Dihydroxyindol umgewandelt, das spontan zu Indoxyl dehydriert. An der Luft verfärbt sich das Indoxyl blau und bildet Indigo.



13.11 Regulation des Toluol/Xylol-Abbauweges

Toluol bindet an den Transkriptionsaktivator XylR und induziert dessen Bindung an den Promotor für die Gene des oberen Abbauweges. Die Gene des oberen Abbauweges wandeln Toluol in Benzoat um, das an XylS, einen weiteren Transkriptionsaktivator, bindet. Der Benzoat/XylS-Komplex bindet dann an den Promotor für die Gene, welche die Enzyme des unteren Abbauweges codieren. Diese bauen Benzoat zu Pyruvat, Acetaldehyd und Kohlendioxid ab.

Die *xyl*-Gene werden durch Toluol oder Benzylalkohol induziert. Diese Induktoren binden an das XylR-Protein, welches die Promotoren für die Gene des oberen Abbauweges (das *xylCMABN*-Operon) sowie das *xylS*-Gen aktiviert (Abb. 13.11). Im oberen Abbauweg entsteht Benzoat. Es dient als Induktor für den unteren Abbauweg, indem es an das XylS-Protein

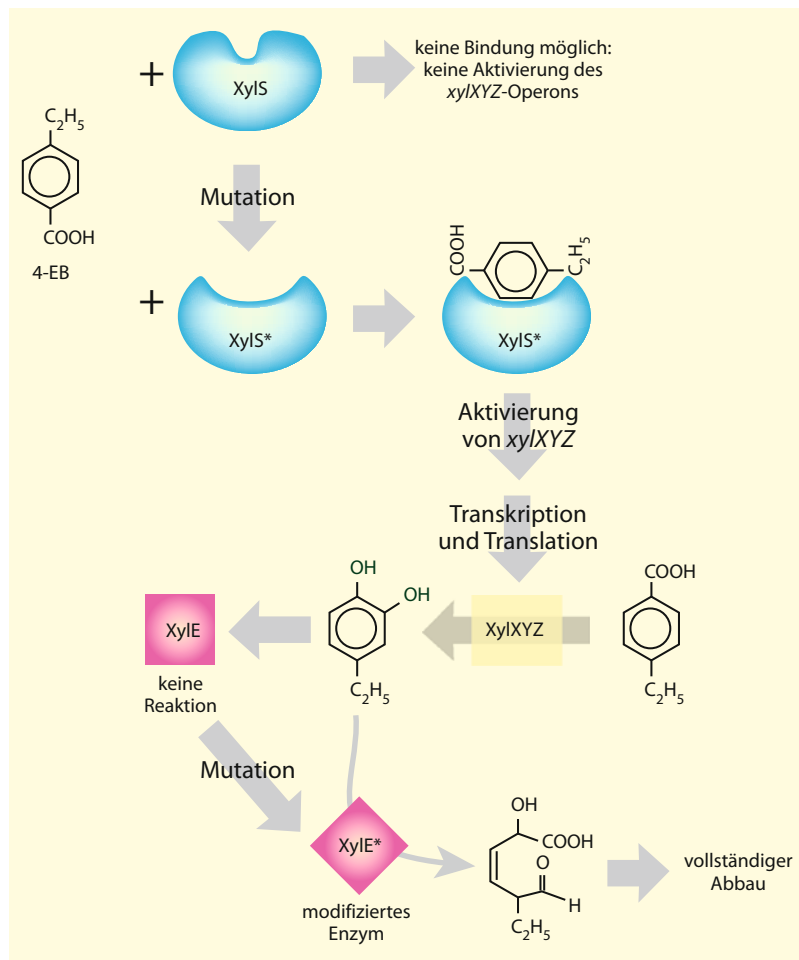
bindet. Dieses aktiviert anschließend den Promotor des unteren Abbauweges und induziert das *xylXYZLEGFJKIH*-Operon. (Durch das XylR-Protein aktivierte Proteine benötigen den alternativen σ -Faktor RpoN [=NtrA], der normalerweise von Genen für den Stickstoffmetabolismus gebraucht wird. Was dies bedeutet, ist noch nicht geklärt.)

Das Tol/Xyl-System kann so modifiziert werden, dass es auch normalerweise nicht verwendete Substrate akzeptiert. So kann der aromatische Kohlenwasserstoff 4-Ethylbenzoat (4-EB) normalerweise nicht über den Xyl-Abbauweg abgebaut werden. Das liegt an zwei Problemen: Erstens erkennt das XylS-Aktivatorprotein 4-EB nicht. Man hat jedoch *xylS**-Mutanten selektiert, die ein modifiziertes XylS-Protein produzieren mit der Fähigkeit, 4-EB zu binden und den oberen Abbauweg zu induzieren. Dadurch wird 4-EB in 4-Ethylbrenzcatechin (Ethylcatechol) umgewandelt. Das zweite Problem besteht darin, dass das *xylE*-Produkt, Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase, von 4-Ethylbrenzcatechin inhibiert wird. Man konnte allerdings eine *xylE**-Mutante isolieren, deren verändertes Protein gegen 4-Ethylbrenzcatechin nicht nur resistent ist, sondern dieses sogar als Substrat nutzen kann. Die *xylS**-*xylE**-Doppelmutante baut 4-Ethylbenzoat vollständig zu Pyruvat und Acetaldehyd ab (Abb. 13.12). Ein derart verbessertes System lässt sich problemlos auf andere Wirtsbakterien übertragen, da es sich bereits in einem Plasmid befindet.

Der Abbauweg für Toluol/Xylol wurde so modifiziert, dass darüber auch viele andere aromatische Verbindungen abgebaut werden können. Für einen vollständigen Abbau dieser Verbindungen benötigt man in der Regel mutierte Enzyme und mutierte Regulatoren mit neuer Spezifität.

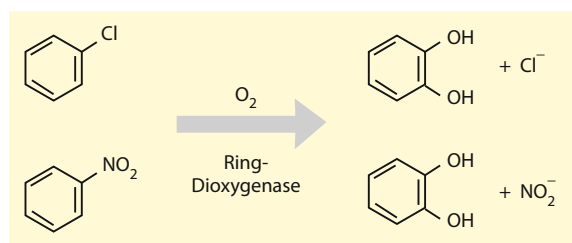
Abspaltung von Halogen-, Nitro- und Sulfonatgruppen

In der Umwelt findet sich eine große Vielfalt an aromatischen Verbindungen, einige kommen dort von Natur aus vor, andere stammen von Verschmutzungen durch den Menschen. Für fast alle dieser Verbindungen lassen sich Bakterien isolieren, die sie abbauen (s. Kap. 12 für *Rhodococcus*). Polychlorierte Biphenyle (PCBs) sind industrielle Schadstoffe. Wei-



13.12 Modifikation des Toluol/Xylol-Abbauweges

Die Enzyme, die Toluol und Xylol abbauen, sind auch zum Abbau anderer Substanzen wie 4-Ethylbenzoesäure (4-EB) in der Lage. Es müssen jedoch zwei Proteine mutiert sein, um das neue Substrat zu erkennen. Für eine Aktivierung der Enzyme des oberen Abbauweges muss der Transkriptionsfaktor XylS so mutiert sein, dass er von 4-EB aktiviert wird. XylE bricht normalerweise die Ringstruktur des Diols auf, kann aber nicht das 4-EB-diol als Substrat verwenden. Der Ring des 4-EB-diols wird nur von einer mutierten Form von XylE aufgebrochen. Mit einem Tol/Xyl-Plasmid, das beide mutierten Gene enthält, transformierte *E. coli* können 4-EB effektiv abbauen.



13.13 Abspaltung von Chlor- und Nitrogruppen durch Dioxygenasen

Dioxygenasen können in aromatische Ringe, die Chlor- oder Nitrogruppen tragen, Hydroxylgruppen einbauen. Dabei werden Chlorid und Nitrit freigesetzt.

Verwendung. Die Chlor-, Nitro- und Sulfonatgruppen können bei der Dioxygenasereaktion abgespalten werden, wobei Chlorid, Nitrit und Bisulfit (Hydrogensulfit) entstehen (Abb. 13.13). Ring-Dioxygenasen bestimmter Bakterien greifen die substituierten Ringe an, während andere von den Chlor-, Nitro- oder Sulfonatgruppen inhibiert werden. Bei ungefähr 10 % der organischen Schadstoffe im Rhein handelt es sich um aromatische Sulfonate aus der deutschen Farbstoffindustrie. Daher überrascht es nicht, dass viele aus dem Rhein isolierte Bakterien Dioxygenasen besitzen, die gut Sulfonat- und Nitrogruppen abspalten können.

tere chlorierte Aromaten sind selektive Herbizide wie 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure). In der pharmazeutischen, Farbstoff- und Detergenzienindustrie finden zahlreiche Nitro- und Sulfonatderivate

Viele aromatische Verbindungen tragen Chlor-, Nitro- oder Sulfonatgruppen. Diese können häufig durch bakterielle Dioxygenasen abgespalten werden.

Bioraffinerie von fossilen Brennstoffen

Das Wachstum der industrialisierten Zivilisation hat insbesondere durch die Nutzung fossiler Brennstoffe als Energie und die Entwicklung der organisch-chemischen Industrie zur Verschmutzung der Umwelt mit einer ganzen Reihe von Verbindungen nichtbiologischer Herkunft beigetragen. Viele Ablagerungen fossiler Brennstoffe, ob Kohle oder Erdöl, enthalten einen hohen Schwefelanteil – bis zu 5 % Schwefel bei Kohle aus Osteuropa oder aus dem amerikanischen Mittelwesten. Bei der Verbrennung von Kohle mit hohem Schwefelgehalt gelangen große Mengen Schwefeldioxid in die Atmosphäre, was zur Entstehung von saurem Regen beiträgt. Lösen ließe sich dieses Problem möglicherweise durch die Entwicklung von Bakterien, welche die problematischen Schwefelverbindungen bereits vor der Verbrennung aus der Kohle (beziehungsweise dem Erdöl) eliminieren könnten.

Mehrere natürlich vorkommende Schwefelbakterien wie *Thiobacillus* und *Sulfolobus* wandeln Pyrit (FeS_2), die hauptsächliche Erscheinungsform von anorganischem Schwefel in Kohle, in lösliches Sulfat um, das mit Wasser ausgewaschen werden kann. Das Hauptproblem besteht also darin, den organischen Schwefel zu beseitigen, insbesondere den in **Thiophen**-Ring(en) enthaltenen. Dieser macht im typischen Fall mindestens 70 % des organischen Schwefels aus (Abb. 13.14). In heute lebenden Organismen findet man Verbindungen, die Thiophenringe enthalten, zwar so gut wie nie, in den organischen Schwefelfractionen fossiler Brennstoffe wie Kohle und Öl bilden sie jedoch einen erheblichen Anteil. Das wichtigste Chinon von Archaeobakterien wie *Sulfolobus* ist Caldariellachinon; dieses enthält einen mit einem Benzochinon fusionierten Thiophenring. Vermutlich

handelt es sich bei den Thiophenen der Kohle um die fossilen Stoffwechselprodukte von Archaeobakterien.

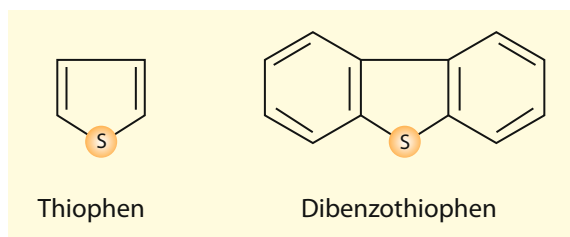
Dibenzothiophen (DBT) ist eine häufig verwendete Modellverbindung (Abb. 13.14) und vermutlich repräsentativ für den in Kohle und Erdöl enthaltenen organischen Schwefel. Der biologische Abbau von DBT und die Beseitigung des Schwefels erfolgen über mehrere Schritte in einem als **4S-Weg** bezeichneten Prozess (Abb. 13.15). Bei den meisten Bakterien, die Thiophenderivate abbauen können, erfolgt der Abbau nicht vollständig. Viele eliminieren den Schwefel nicht gänzlich aus seiner organisch gebundenen Form, andere verwenden als Substrat nur bereits auf die Sulfon- oder Sulfoxidstufe oxidiertes DBT (s. Abb. 13.15). Für eine vollständige Entschwefelung muss man entweder ein natürliches Isolat finden, das sämtliche Schritte ausführen kann, oder die einzelnen Schritte des 4S-Weges aus verschiedenen Bakterien genetisch in einem einzigen modifizierten Stamm zusammenfügen.

Bestimmte Bakterien, vor allem bestimmte *Rhodococcus*-Arten, entschwefeln Dibenzothiophen tatsächlich vollständig, genauso wie sie verwandte Heterozyklen wie Dibenzofuran und Xanthone abbauen. Das **dszABC-Operon** von *Rhodococcus* befindet sich auf einem linearen Plasmid und codiert drei Enzyme des 4S-Weges. Zusätzlich wird eine vom *dszD*-Gen codierte Flavin-Reduktase benötigt, die reduziertes FMN liefert (s. Abb. 13.15). Das *dszD*-Gen ist nicht mit dem *dszABC*-Operon verbunden. Die Enzyme sind folgende:

- dritter Schritt: DszA = Dibenzothiophensulfon-Oxygenase
- vierter Schritt: DszB = Benzolsulfinat-Desulfinas
- erster und zweiter Schritt: DszC = Dibenzothiophen-Oxygenase
- Bereitstellung von FMNH_2 : DszD = Flavin-Reduktase

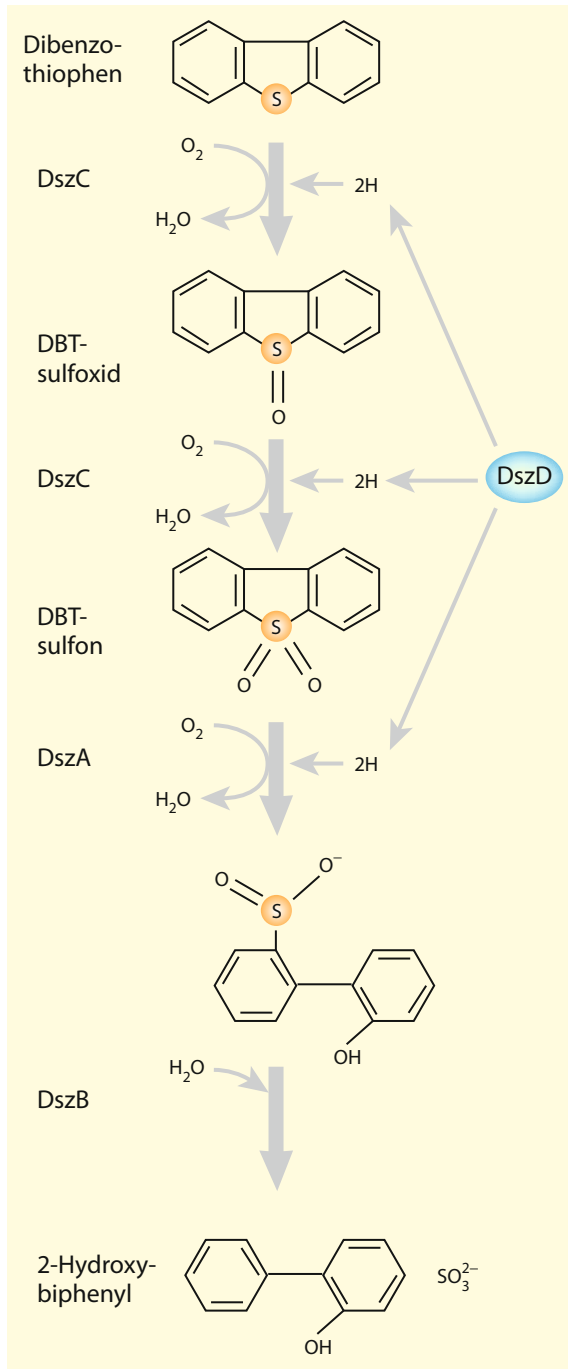
Diese natürlichen Isolate bringen jedoch einige Probleme mit sich:

1. *Rhodococcus* ist genetisch nicht besonders gut erforscht, was eine weitere Modifikation erschwert.
2. Zur Entschwefelung von Kohle oder Erdöl benötigt man widerstandsfähige Bakterien, die leicht in hoher Dichte zu vermehren sind. *Rhodococcus* ist in dieser Hinsicht nicht besonders geeignet.
3. In der Natur dienen die Entschwefelungsgene (*dszABC*) von *Rhodococcus* dazu, Schwefel zu erlangen (und nicht zum Abbau von Dibenzothiophenen zum Gewinn von Kohlenstoff und Energie). Folglich werden sie nur in geringen Mengen exprimiert, weil die Bakterien für ihr



13.14 Thiophen und Dibenzothiophen

Der in Kohle und anderen fossilen Brennstoffen enthaltene organische Schwefel ist vor allem auf die schwefelhaltigen Moleküle Thiophen und Dibenzothiophen zurückzuführen.



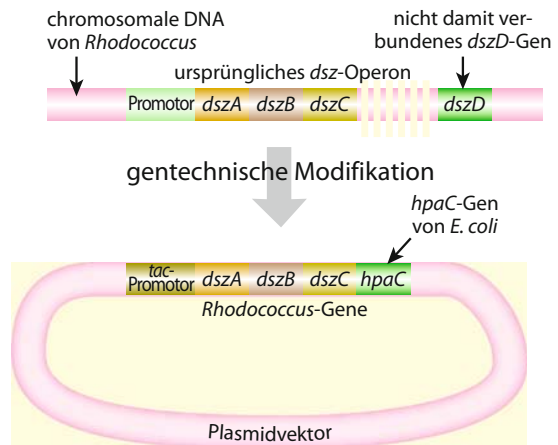
13.15 Der 4S-Weg zur Eliminierung von Schwefel aus Thiophenringen

Dibenzothiophen wird von der Oxygenase DszC mithilfe von DszD, einer Flavin-Reduktase, welche die Reduktionsäquivalente liefert, in Sulfoxid umgewandelt. Die beiden gleichen Enzyme wandeln Sulfoxid in Sulfon um. Danach bricht DszA, eine weitere Oxygenase, die Ringstruktur auf. Abschließend setzt DszB den Schwefel in Form von Sulfat frei.

Wachstum nur kleine Mengen Schwefel benötigen. Zudem reprimieren andere anorganische und organische Schwefelverbindungen das Operon. Deshalb würde der in Kohle oder Erdöl (mit hohem Schwefelgehalt) meist vorhandene anorganische Schwefel die *dszABC*-Gene reprimieren. Ebenfalls reprimiert würden diese Gene, wenn die Bakterien zuvor auf einem organischen Medium gezüchtet wurden, das schwefelhaltige Aminosäuren wie Cystein oder Methionin enthält.

Deshalb hat man das *dszABC*-Gencluster von *Rhodococcus* kloniert und in geeignete Plasmide für die Expression in *E. coli* und in bestimmten widerstandsfähigen *Pseudomonas*-Stämmen eingebaut. Man hat die *dszABC*-Gene der Kontrolle starker Promotoren unterstellt, die nach Bedarf induziert werden können und nicht von Schwefelverbindungen reprimiert werden (Abb. 13.16). Die so erzeugten Stämme entschwefeln DBT besser als herkömmliche *Rhodococcus*.

Für eine hohe Produktivität des 4S-Weges müssen große Mengen von Reduktionsäquivalenten bereitgestellt werden. In Zellen mit einem klonierten *dszABC*-Operon wird die Reduktion von FMN durch



13.16 Gentechnische Modifikation des Dsz-Systems

Die für die Entschwefelung von Dibenzothiophen codierenden Gene von *Rhodococcus* wurden kloniert und in ein Plasmid überführt. Für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten benötigen die drei Enzyme DszC, DszA und DszB eine Flavin-Reduktase. *Rhodococcus* verwendet dazu das Produkt seines *dszD*-Gens, effektiver funktioniert allerdings die Flavin-Reduktase von *E. coli* (codiert durch *hpaC*). Daher wird das *hpaC*-Gen von *E. coli* auf demselben Plasmid überexprimiert. Die Transkription des gesamten Genclusters steht unter der Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors.

Flavin-Reduktase zum limitierenden Faktor bei der Eliminierung von Schwefel aus Dibenzothiophen. Flavin-Reduktase aus anderen Bakterien funktioniert jedoch ebenso gut oder sogar besser als das DszD-Enzym von *Rhodococcus*. So hat man beispielsweise das Gen für das HpaC-Enzym aus *E. coli* kloniert und in großen Mengen exprimiert; dieses Enzym beschleunigt die Entschwefelung erheblich. Als weitere Modifikation hat man das *hpaC*-Gen und die *dszABC*-Gene zu einem einzigen Operon unter der Kontrolle des **tac-Promotors** gekoppelt. (Dies ist ein Hybridpromotor mit der RBS des *trp*-Promotors und dem Operator des *lac*-Promotors. Es handelt sich daher um einen starken Promotor, der von IPTG induziert wird.) Somit kann, falls erforderlich, IPTG das kombinierte Entschwefelungsmodul induzieren.

Obwohl das DszC-Enzym an den Schwefel von Dibenzothiophen Sauerstoff addiert, ist es nahe verwandt mit den Ring-Dioxygenasen, die an aromatische Ringe zwei Hydroxylgruppen anhängen. So hydroxyliert Phenanthren-Dioxygenase Phenanthren (einen aromatischen Kohlenwasserstoff mit drei Ringen), wandelt aber auch DBT in sein Sulfon um. Durch Mutation der Biophenyl-Dioxygenase durch Gen-Shuffling (s. Kap. 11) entstehen ebenfalls Enzymmutanten, die Dibenzothiophen und verwandte Verbindungen als Substrat nutzen können. In diesen Fällen bewirkt dasselbe Enzym die Hydroxylierung der aromatischen Ringe und die Addition von Sauerstoff an den Thiophenschwefel; dadurch entsteht zunächst das Sulfoxid und anschließend das Sulfon. Das DszC-Enzym muss ebenfalls mutiert vorliegen, um das Spektrum seiner Substrate zu erweitern. Beispielsweise ermöglicht die Mutation Val261Phe eine Oxidation von Methylbenzothiophen und Alkylthiophenen.

Zu den großen Leistungen im Stoffwechsel-Engineering zählt die Zusammenstellung eines Abbauweges für die schwefelhaltigen Thiophenringe, wie sie häufig in fossilen Brennstoffen enthalten sind.

Biosynthese mittelgroßer Moleküle

Mit Ausnahme der Produktion von Alkohol und Indigo haben wir uns bisher mit Abbauvorgängen befasst. Bei den Gärungsprozessen, durch die Alkohol entsteht, soll Energie aus Zuckern freigesetzt werden,

und Indigo ist ein zufällig beim Abbau von Naphthalin entstehendes Nebenprodukt. Zahlreiche Naturprodukte werden jedoch industriell auch mit Methoden hergestellt, die auf den natürlichen Biosynthesewegen beruhen. So werden beispielsweise zahlreiche Aminosäuren von Mikroorganismen produziert und für vielfältige Zwecke verwendet. Hier soll es nun um etwas komplexere Moleküle gehen. Zunächst befassen wir uns mit ausgewählten Sterinen und Antibiotika, anschließend mit einigen Beispielen für Biopolymere. Dabei sollen die Synthesewege nicht im Detail behandelt werden, sondern lediglich beispielhaft zeigen, wie sich diese Prozesse gentechnisch verbessern lassen.

Antibiotika und Sterine sind nur mäßig komplexe Moleküle, zählen aber zu den Molekülen, deren gentechnische Modifikation mit den größten Schwierigkeiten einhergeht. Das liegt daran, dass ihre Synthesewege 20 oder mehr Schritte umfassen können. Für jeden Schritt wird ein anderes Enzym benötigt, das wiederum von einem eigenen Gen codiert wird. Überdies sind viele dieser Synthesewege verzweigt und/oder interagieren mit anderen Stoffwechselwegen. Infolgedessen ist ihre Regulation oft komplex. Gene, die Enzyme und Regulationsproteine für lange und komplexe Synthesewege codieren, zu analysieren, zu klonieren und zu exprimieren, ist mit einem sehr hohen Aufwand verbunden.

Für die Biosynthese kleiner Moleküle müssen normalerweise mehrere Enzyme nacheinander einwirken. Folglich stellt die Manipulation von Antibiotika, Sterinen, Opiaten und so weiter eine große Herausforderung dar.

Synthese und Modifikation von Sterinen

Das Grundgerüst der **Sterine** (oder Sterole) besteht aus vier miteinander verknüpften Ringen: drei sechsgliedrige Ringe und ein fünfgliedriger Ring (Beispiele zeigt Abb. 13.17). Pflanzen, Tiere und Pilze synthetisieren viele verschiedene Sterine, die meisten Bakterien hingegen nicht, denn zur Sterinsynthese wird molekularer Sauerstoff benötigt, und viele Bakterien leben unter anaeroben Bedingungen. Dennoch besitzen zahlreiche Bakterien Enzyme zur Modifikation der Struktur von Sterinen, die von anderen Organismen synthetisiert wurden.

Exkurs 13.1

Stoffwechsel-Engineering mittels integrierter Regulationskreise

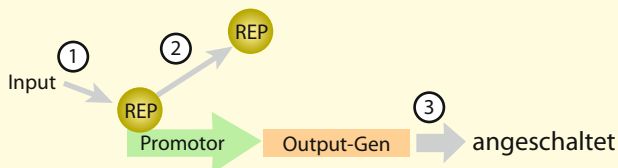
Neue Synthesewege lassen sich auch auf eine allgemeinere Weise erstellen, wobei die Anordnung von Genen und Promotoren im Mittelpunkt steht und nicht die eigentlichen Genprodukte und Metaboliten. Wissenschaftler, die sich mit **genetischen Regulationskreisen** befassen, erforschen häufig nicht einen bestimmten Syntheseweg, sondern verwenden stattdessen Modellgene, denn neue Anordnungen könnten auch ein neues Verhalten von Zellen zur Folge haben. Zum Beispiel kann die Anordnung der Gene dafür sorgen, dass das letztendliche Genprodukt besonders stabil ist, dass die Häufigkeit des Endprodukts einer bestimmten Schwankungsbreite unterworfen ist oder dass das Produkt nur dann exprimiert werden kann, wenn ein bestimmtes Protein in der Umwelt vorhanden ist oder zugegeben wird, und somit ein **Biosensorsystem** darstellt.

Als Beispiel für ein Biosensorsystem kann gelten, wenn ein bestimmter Schadstoff (der Input) bewirkt,

dass eine Zelle grün fluoresziert (der Output). Durch die Anwesenheit des Schadstoffes wird das Gen für das grün fluoreszierende Protein angeschaltet. Dazu sind mehrere Gene in einer Transkriptionskaskade erforderlich, die steuern, ob GFP produziert wird oder nicht. Durch Manipulation der Anordnung von Kontrollelementen wie Enhancern und Repressoren kann man Zellen höchst sensitiv oder weniger sensitiv für den Schadstoff machen.

Abbildung A zeigt einige zur Regulation der Genexpression verwendete Motive. Das erste ist ein einfaches an- und abschaltbares Dosiskompensationsmotiv (engl. *on/off dosis compensation motif*). Im vorliegenden Beispiel könnte der Schadstoff an das Repressorprotein binden, welches das GFP-Gen reguliert. Bei Anwesenheit des Schadstoffes wird der Repressor vom GFP-Gen abgezogen, und die Zellen fluoreszieren. Eine andere Form eines Regulationskreises ist das Feedforward-Motiv. Hierbei reguliert ein Mastergen mehrere Synthesewege. Ein drittes

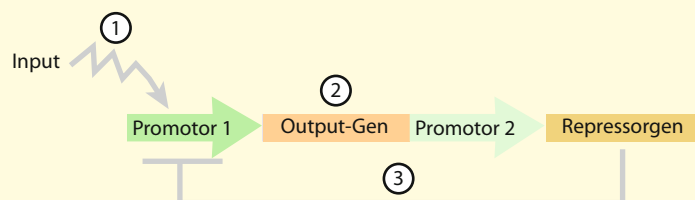
an- und abschaltbares Motiv



Feedforward-Motiv



regulatorisches Feedback



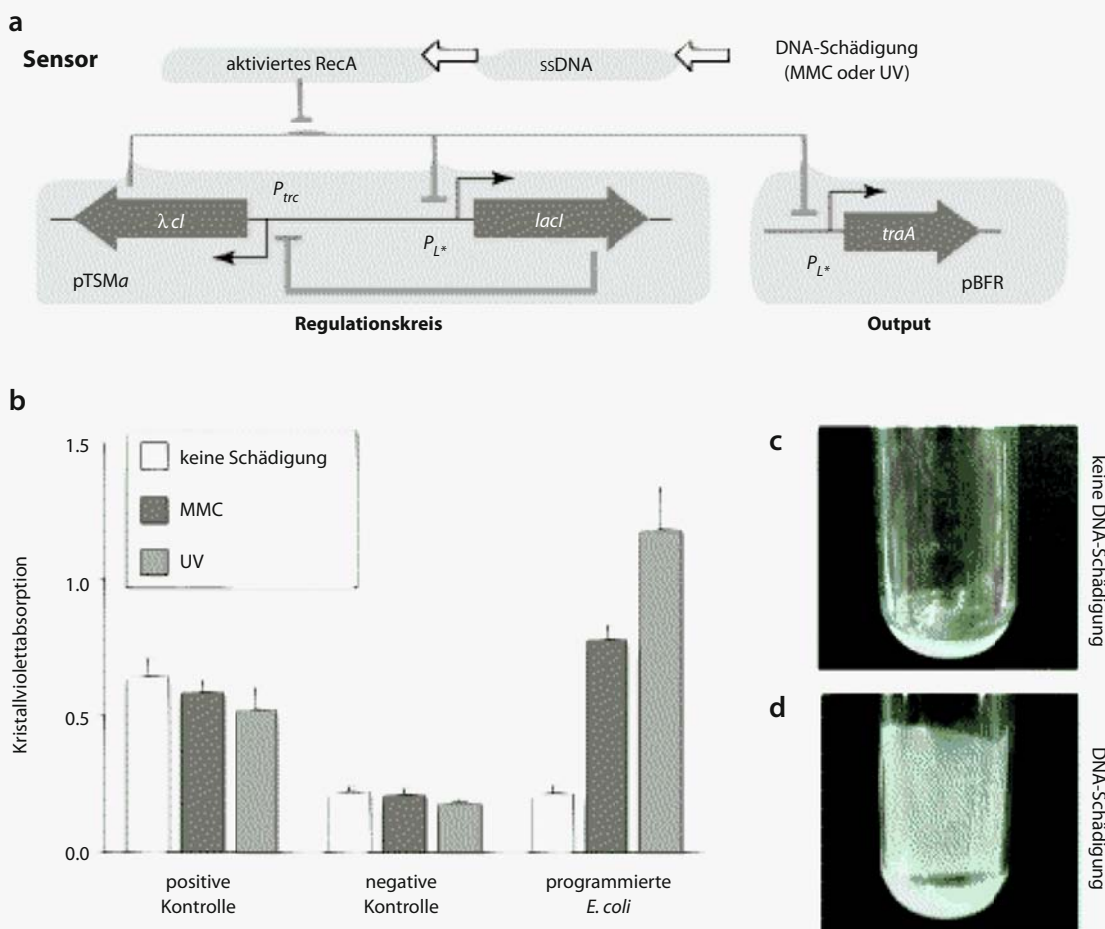
A Schematische Darstellung verschiedener genetischer Regulationskreise

Bei einem einfachen an- und abschaltbaren Motiv (*oben*) verhindert ein Repressorprotein die Transkription und Translation des Output-Gens. Bei Ankommen des Input-Signals wird der Repressor vom Promotor abgelöst und das Output-Gen aktiviert. Beim Feedforward-Motiv (*Mitte*) reguliert ein Masterkontrollgen verschiedene Gene (hier mit 1 bis 5 bezeichnet). Das Input-Signal aktiviert den Promotor für das Masterkontrollgen, welches wiederum die Gene 1 bis 5 aktiviert. Beim regulatorischen Feedback-Motiv (*unten*) sind zwei Gene im Tandem mit verschiedenen Promotoren gekoppelt. Promotor 2 wird ständig exprimiert, sodass Repressorprotein synthetisiert wird. Das verhindert die Expression von Promotor 1, bis ein Input-Signal eintrifft. Dann wird der Repressor freigesetzt und das Output-Gen exprimiert.

Motiv funktioniert über ein regulatorisches Feedback. In diesem Fall reprimiert das Endprodukt des Gens den gesamten Syntheseweg. Alle diese Motive kommen in der Natur vor und können im Stoffwechsel-Engineering dazu dienen, die Produktion des Endprodukts zu regulieren.

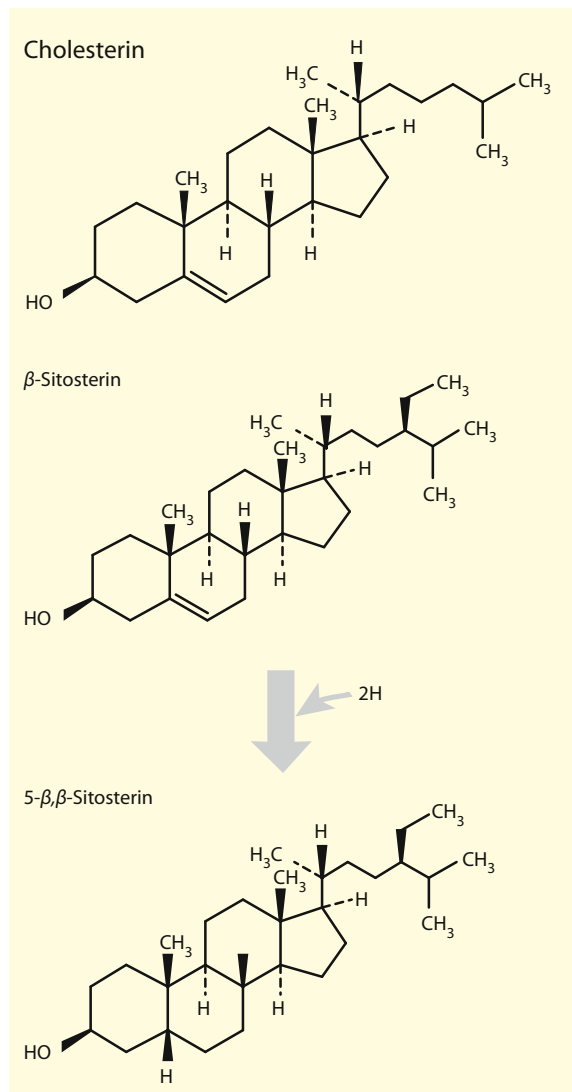
In *E. coli* kann man auch neue genetische Regulationskreise einbauen. So bewirkte beispielsweise das in Abbildung B dargestellte System, dass *E. coli* als Reaktion auf DNA-Schädigung einen Biofilm produzierte. Der genetische Regulationskreis umfasste den Input UV-Licht

oder Mitomycin C, der eine Schädigung der DNA verursacht, einen Regulationskreis aus Repressorgen und ein Output-Modul, bei dem das Biofilmgens (*traA*) von einem Promotor kontrolliert wurde, der auf Repressoren reagiert. Die Zellen produzierten nur dann einen sichtbaren Biofilm, wenn Schäden an der DNA das RecA-Protein aktivierten. Das RecA-Protein verhindert, dass der Regulationskreis das Output-Modul reprimiert. Bei einer Aktivierung von RecA wurde damit der Output – in diesem Fall der Biofilm – erzeugt.



B Von *E. coli* als Reaktion auf eine Schädigung der DNA produzierte Biofilm

Neuartiges Input-Output-System, das bei Feststellung von DNA-Schäden die Bildung eines Biofilmes induziert. **a** Genetisches Netzwerk, das Schäden an der DNA (Input) mit der Bildung eines Biofilmes (Output) verknüpft. Der Repressor *cl* inhibiert normalerweise die Expression von *lacI* vom Promotor P_{L^*} . Eine Schädigung der DNA bewirkt die Aktivierung von RecA, das *cl* spaltet und dadurch inaktiviert. Dadurch kann *lacI* exprimiert werden, das die Expression von *cl* hemmt. Ohne *cl* produziert die Zelle auch *TraA*, was zur Bildung eines Biofilmes führt. **b** Kristallviolettabsorption kontrollierter und modifizierter Stämme nach Einwirken der DNA-schädigenden Agenzien Mitomycin C (MMC) und UV-Strahlung. Eine erhöhte Kristallviolettabsorption zeigt die Bildung eines Biofilmes an. **c** In einem Reagensglas mit modifizierten Zellen, die keinen DNA-schädigenden Agenzien ausgesetzt waren, ist keine Biofilmbildung zu erkennen. Aus: McDaniel und Weiss (2005) *Curr Opin Biotechnol* 16: 476–483. Copyright 2005. National Academy of Sciences, USA.



13.17 Sterine und Stanole

Cholesterin, ein tierisches Sterin, und das pflanzliche Sterin β -Sitosterin haben eine ähnliche Struktur. β -Sitosterin kann zu dem Stanol 5- β , β -Sitosterin reduziert werden, das bei der Nährstoffaufnahme mit Cholesterin in Konkurrenz tritt und dadurch dessen Aufnahme vermindert.

Sterine dienen zum einen als Membranbestandteile (z.B. Cholesterin), zum anderen als Hormone. (Steroidhormone aktivieren die Genexpression über Rezeptorproteine. Bei den **Steroiden** handelt es sich um Sterinderivate mit Keto- anstelle von Hydroxylgruppen.) Von anderen Organismen synthetisierte oder modifizierte Sterine können bei Tieren nachhaltige Auswirkungen haben, indem sie die Funktion der

natürlichen Steroidhormone beeinflussen. Zusätzlich ahmen auch verschiedene vom Menschen hergestellte Moleküle Steroide in ihrer Wirkung nach. Steroidhormone regulieren viele verschiedene Prozesse. Am augenfälligsten waren jedoch die Auswirkungen von Sterinen in der Umwelt auf die Fortpflanzung. Viele von ihnen wirken durch Bindung an Östrogenrezeptoren. Infolgedessen werden diese Verbindungen mitunter auch als **Xenöstrogene** bezeichnet.

Cholesterin und seine Analoga wirken sich nachdrücklich auf die menschliche Gesundheit aus. So beeinflusst beispielsweise der Cholesterinspiegel im Blut die Verstopfung von Arterien durch Fettablagerungen (Arteriosklerose). Weitgehend verhindert werden kann die Absorption von Cholesterin aus der Nahrung durch viele pflanzliche Sterine, vor allem durch ihre hydrierten Derivate, die **Stanole**. Das Steringerüst enthält eine Doppelbindung an der Position 5–6 des zweiten Ringes (Abb. 13.17). Wird diese zu einer Einfachbindung reduziert, so entsteht ein Stanol mit völlig anderen biologischen Eigenschaften. Wenn man viel pflanzliche Kost zu sich nimmt, die reich an solchen Stanolen ist, kann man die Aufnahme von Cholesterin aus der Nahrung verringern. Dies wirkt sich positiv auf die Gesundheit aus. Deshalb werden pflanzliche Sterine bisweilen bei der Nahrungsmittelverarbeitung zu den entsprechenden Stanolen hydriert. Dies kann chemisch oder mithilfe von Mikroorganismen erfolgen.

Viele Bakterien besitzen Sterin-modifizierende Enzyme, die verschiedenste Reaktionen katalysieren. Einige können die 5–6-Doppelbindung reduzieren und dadurch Sterine in Stanole umwandeln. Darüber hinaus können einige Bakterien, insbesondere Arten der Gattung *Eubacterium*, Cholesterin selbst zu Coprostanol reduzieren, das vom Darm nur schlecht absorbiert wird. Daher sind Sterin-modifizierende Enzyme potenziell von großem Nutzen für die Nahrungsmittelverarbeitung, aber vielleicht auch für den Abbau von Xenöstrogenen in der Umwelt. Man hat mehrere Gene für Sterin-modifizierende Enzyme aus *Eubacterium* kloniert, in *E. coli* exprimiert und die entsprechenden Enzyme gereinigt und charakterisiert.

Zur Herstellung von Sterinen, die zu therapeutischen Zwecken einsetzbar sind, könnte sich das Stoffwechsel-Engineering ebenfalls als nützlich erweisen. Steroide wie Cortison und Prednison werden zur Behandlung von Entzündungskrankheiten (wie Arthritis, Colitis, Allergien und Hautprobleme) eingesetzt. Weiterhin finden Steroide zur Empfängnisverhütung und zur Behandlung von Hormonmangelsyndromen Verwendung. Heute stellt man diese Steroide in ver-

schiedenen chemischen und mikrobiellen Schritten aus pflanzlichen Sterinen her. Dem Stoffwechsel-Engineering wird letztlich die Aufgabe zukommen, einen einzigen Mikroorganismus zu erzeugen, der sämtliche für die Herstellung eines bestimmten Produkts erforderlichen Modifikationsschritte ausführen kann.

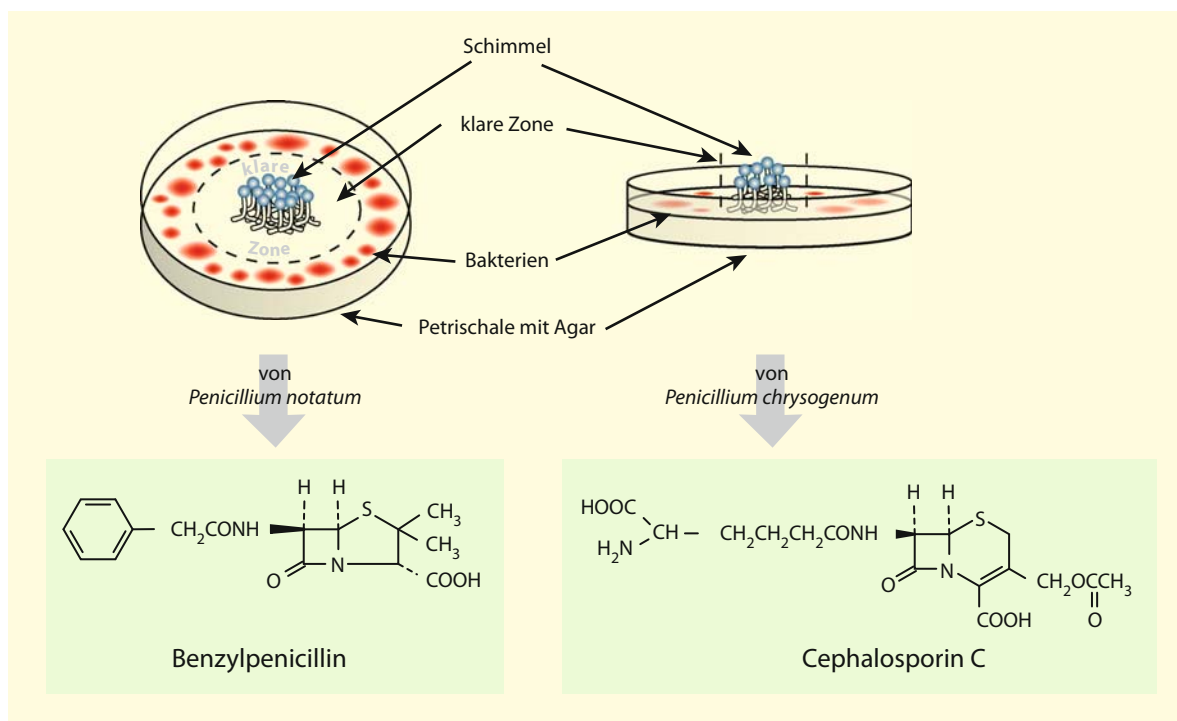
Sterine, vor allem pflanzlicher Herkunft, werden durch Stoffwechsel-Engineering zu den verschiedensten Produkten modifiziert. Einige dienen als Pharmazeutika, andere als Zusatzstoffe für Lebensmittel.

Biosynthese von β -Lactam-Antibiotika

In den 1920er-Jahren entdeckte Alexander Fleming, dass ein Schimmelpilz **Penicillin** produziert – der klassische Fall einer zufälligen Entdeckung. Fleming ließ Petrischalen mit Bakterienkulturen so lange ste-

hen, dass sich darauf Schimmelpilze bildeten. Dann bemerkte er um den blauen Schimmel aus der *Penicillium*-Verwandtschaft eine klare Zone, in der die Bakterien abgetötet und aufgelöst worden waren. Er ging der Sache nach und stellte fest, dass der Pilz eine für Bakterien toxische, für Tiere jedoch harmlose Substanz bildete: Penicillin. Fleming nannte den Pilz ***Penicillium notatum***. Der mit diesem verwandte Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* produziert das ähnliche Antibiotikum **Cephalosporin C**. Beide sind Vertreter der Familie der **β -Lactam-Antibiotika** und werden auf getrennten Zweigen des gleichen Biosyntheseweges gebildet (Abb. 13.18).

Die von den Schimmelpilzen synthetisierten β -Lactam-Antibiotika können chemisch zu vielen verschiedenen Antibiotika verändert werden. Cephalosporin C hat selbst nur eine schwache antibakterielle Wirkung, bildet jedoch den Ausgangspunkt für eine Vielzahl von Breitspektrumanantibiotika, die durch chemische Modifikation entstehen. Dazu muss Cephalosporin C zunächst in 7-ACS (7-Aminocephalosporansäure) umgewandelt werden; bislang ist noch kein Organismus bekannt, der diese produziert.



13.18 Biosynthese von β -Lactam-Antibiotika

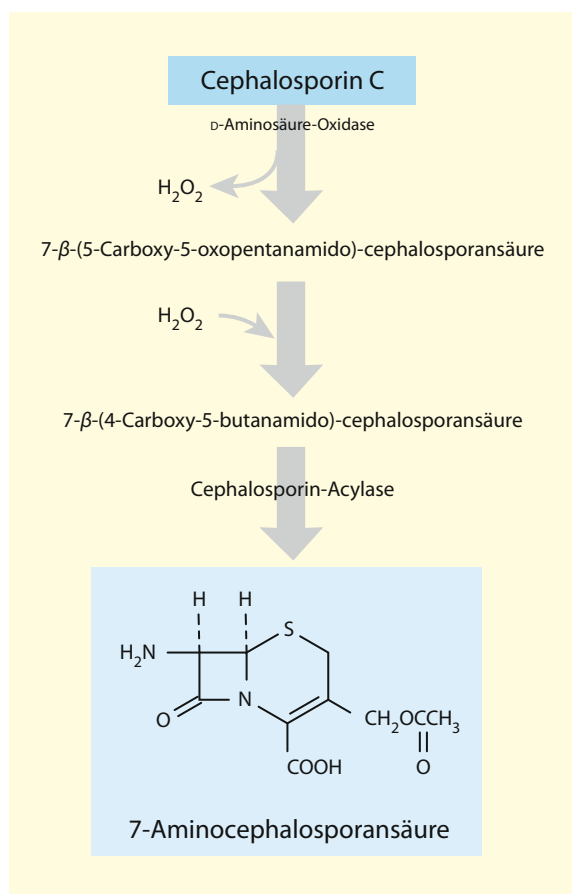
Wenn sich auf ursprünglich mit Bakterienkolonien übersättem Agar bestimmte Schimmelpilze ausbreiten, bildet sich um den Schimmel herum eine klare Zone, in der keine Bakterien wachsen können. Diese ist auf Antibiotika wie Penicillin oder Cephalosporin C zurückzuführen, die von dem Schimmel gebildet werden.

Ursprünglich führte man diesen Schritt chemisch durch und erhielt nur einen sehr geringen Ertrag. Nun ist es vor kurzem gelungen, einen Schimmelpilz, der Cephalosporin C synthetisiert, so zu modifizieren, dass er dieses in 7-ACS umwandelt. Für diesen erweiterten Syntheseweg mussten zwei zusätzliche Gene eingebaut werden (Abb. 13.19). Das Gen für D-Aminosäure-Oxidase stammte von dem Pilz *Fusarium solani*, das Gen für Cephalosporin-Acylase von dem Bakterium *Pseudomonas diminuta*.

Die 7-ACS dient als Ausgangsverbindung für eine ganze Reihe chemischer Modifikationen, die Antibiotika mit unterschiedlichen Eigenschaften liefern.

Darunter sind Varianten mit einer Resistenz gegen bakterielle β -Lactamasen und solche, die besser in Bakterienzellwände eindringen, aber auch Antibiotika mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften (die z.B. vom Darm besser absorbiert werden).

Die meisten β -Lactam-Antibiotika entstehen durch chemische Modifikation. Durch die Veränderung des ursprünglichen β -Lactam-Syntheseweges von Schimmelpilzen der Gattung *Penicillium* konnte man den Ertrag dieser Antibiotika deutlich steigern.



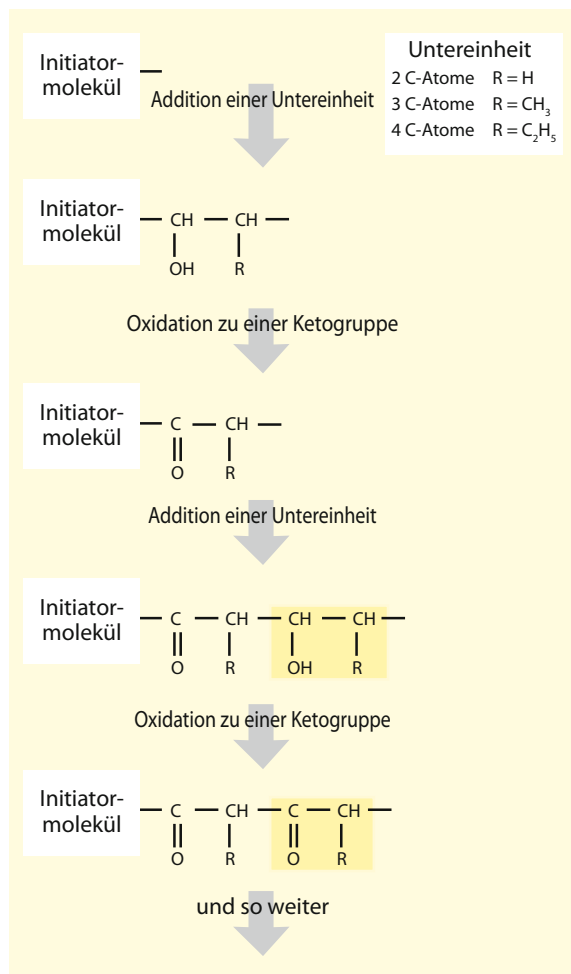
13.19 Modifizierter Syntheseweg für 7-ACS

Zur Herstellung neuer antibakterieller Verbindungen muss man Cephalosporin C in 7-Aminocephalosporansäure (7-ACS) umwandeln. An dieser Umwandlung sind die Enzyme D-Aminosäure-Oxidase und Cephalosporin-Acylase beteiligt. Die Gene für diese Enzyme wurden isoliert, kloniert und in verschiedenen Bakterien exprimiert, aber auch in Schimmelpilzen, die selbst Cephalosporin C produzieren.

Polyketide und Polyketidantibiotika

Immer mehr pathogene Mikroorganismen entwickeln durch Mutationen eine Resistenz gegenüber Antibiotika. Dadurch ergeben sich bei der Behandlung von Patienten mit bestimmten Infektionskrankheiten zunehmend Probleme. Es werden ständig neue Antibiotika zur Behandlung von Infektionen benötigt, gegen die die früheren Generationen von Antibiotika wirksam waren. Zwar werden auch in der Natur immer noch neue Antibiotika entdeckt, und einige lassen sich durch Modifikation einer Ausgangsverbindung (wie 7-ACS, s. vorne) herstellen, es führt jedoch kein Weg daran vorbei, neue Möglichkeiten zu finden.

Bei der kombinatorischen Biosynthese werden Gene für nützliche Naturprodukte so manipuliert, dass dadurch zahlreiche mögliche Varianten entstehen. Diese kann man dann auf abweichende und/oder verbesserte Wirkungen hin überprüfen. In der Praxis lassen sich nur bestimmte recht flexible biochemische Synthesewege durch derartige Manipulationen modifizieren. Das beste Beispiel liefert der **Polyketidweg** (Abb. 13.20). Polyketide sind lineare Polymere. Ihre Synthese geht von einem kleinen Initiator-molekül aus, das durch die Addition von Untereinheiten aus zwei, drei oder vier Kohlenstoffatomen verlängert wird. Jede Untereinheit steuert zwei Kohlenstoffatome zu dem wachsenden Polymerrückgrat bei, die anderen Kohlenstoffatome bilden Verzweigungen (Methyl- oder Ethylgruppen). Bei der eigentlichen Synthese trägt jedes zweite Kohlenstoffatom des Polymerrückgrats eine Ketogruppe – daher der Name *Polyketid*. Einige der Ketogruppen können jedoch während der



13.20 Prinzip des Polyketidweges

Polyketide werden durch Addition von kleinen Untereinheiten aus zwei, drei oder vier Kohlenstoffatomen an ein Initiator-molekül (blau) synthetisiert. Bei jeder Addition einer Untereinheit entsteht durch Oxidation am benachbarten C-Atom eine Ketogruppe (C=O). Durch jede weitere Untereinheit wird die Kette um zwei Kohlenstoffatome verlängert; alle weiteren C-Atome werden zu Seitenketten (in der Abbildung mit einem R bezeichnet).

Verlängerung des Polymers zu Hydroxylgruppen oder CH₂-Gruppen reduziert werden.

Nach der Synthese bildet die Polyketidkette verschiedene Ringsysteme und wird auf unterschiedliche Weise modifiziert. Mehrere Familien von Antibiotika gehören zu den Polyketiden, die bekanntesten davon sind die **Tetracycline** und die **Macrolide** (z.B. **Erythromycin**). Bestimmte Bakterien stellen diese Antibiotika von Natur aus her, vor allem Vertreter

der Familie Actinomyceten. Die Gene für die Synthesewege der Antibiotika bilden normalerweise Cluster, was sich für die Klonierung und Manipulation als recht praktisch erweist.

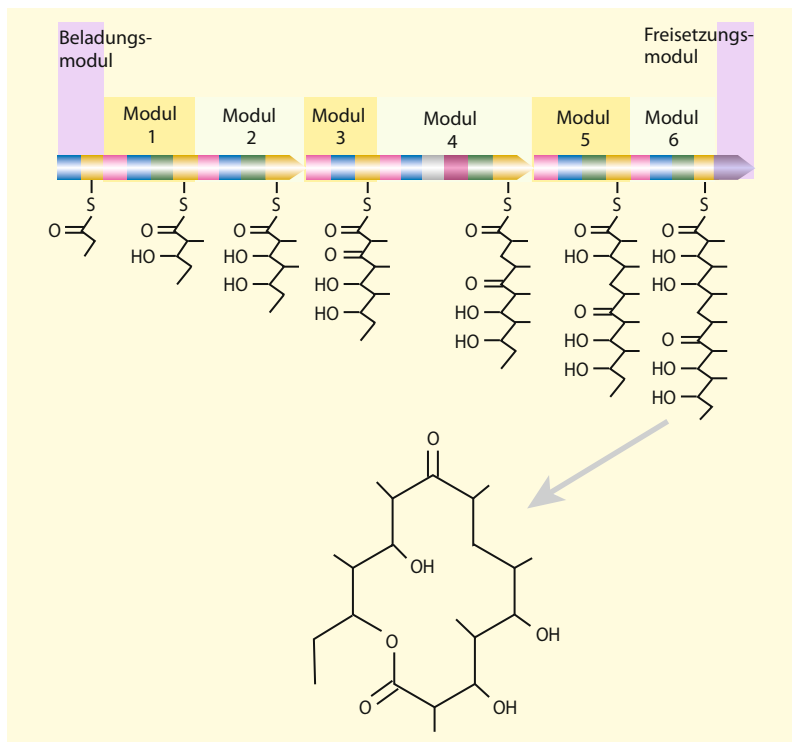
Die Polyketid-Synthasen bestehen aus Modulen, von denen jedes für die Addition und Modifikation einer Polyketiduntereinheit verantwortlich ist. Jedes der Module umfasst folgende Enzymaktivitäten:

- „Beladungsenzym“ (engl. *loading enzyme*): transportiert die wachsende Kette über einen Thiolester
- Kettenverlängerungsenzym: wählt die korrekten ankommenden Untereinheiten aus (d.h. mit zwei, drei oder vier Kohlenstoffatomen) und verbindet diese mit der wachsenden Kette
- optionale Reduktase: wandelt die Ketogruppe in eine Hydroxylgruppe um
- optionale Reduktase: wandelt die Hydroxylgruppe in Methylen um
- Transferase: transportiert das wachsende Polyketid zum nächsten Modul

Das Erythromycinsystem besteht zum Beispiel aus sechs Modulen, die jeweils eine 3C-Untereinheit anfügen, plus einer Beladungsdomäne, die das Initiator-molekül aufgreift, und einer Freisetzungsdomäne. Diese Module sind auf drei separaten Polyketidketten angeordnet (Abb. 13.21). Nach der Freisetzung schließt sich die Erythromycinvorstufe zu einem Ring zusammen und wird durch Addition zweier Zuckerderivate modifiziert.

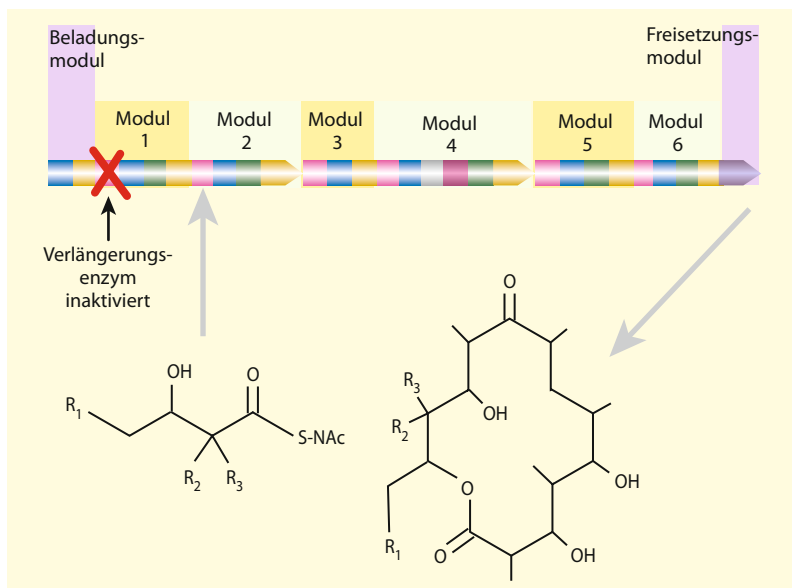
Zur Modifikation von Polyketidwegen wie dem für Erythromycin gibt es vor allem zwei Möglichkeiten. Erstens kann man das Polymerisierungsenzym von Modul 1 inaktivieren. Dadurch wird eine Verlängerung des natürlichen Initiator-moleküls verhindert. Danach wird ein künstlich erzeugtes Analogon hinzugegeben, das an Modul 2 in den Polyketidweg integriert wird. Sämtliche chemische Gruppen, die in dem Initiatoranalogon vorhanden sind, werden im späteren Polyketidprodukt enthalten sein (Abb. 13.22).

Eine noch größere Vielfalt von Polyketiden kann man erzeugen, indem man die Module der Polyketid-Synthase genetisch verändert. So könnte man beispielsweise ein Modul, das eine Ketogruppe in eine Hydroxylgruppe verwandelt, so verändern, dass die Ketogruppe unangetastet bleibt oder weiter zu einer Methylengruppe (CH₂) reduziert wird. Ebenso könnte man ein Modul, das eine Untereinheit mit zwei C-Atomen einbaut, durch eine Modifikation zum Einbau einer Vorstufe mit drei oder vier C-Atomen veranlassen und somit Methyl- oder Ethylsei-



13.21 Modularer Polyketidweg für Erythromycin

Die Polyketid-Synthese für Erythromycin weist für jede Untereinheit, die an die Polyketidkette addiert wird, ein separates Modul auf. Das Beladungsmodul enthält eine Sulfhydrylgruppe für die Bindung an das Initiormolekül. Die Module 1 und 2 fügen jeweils eine Untereinheit mit drei Kohlenstoffatomen hinzu und reduzieren deren Ketogruppen zu Hydroxylgruppen. Modul 3 fügt wieder eine Untereinheit aus drei C-Atomen an. Jedes folgende Modul addiert eine weitere Untereinheit, bis die wachsende Kette das Freisetzungsmodul erreicht, durch das die fertige Kette freigesetzt wird. Anschließend schließt sich die Polyketidkette zu einer ringförmigen Vorstufe zusammen, die weiter modifiziert wird (hier nicht dargestellt) zu Erythromycin.



13.22 Modifikation von Polyketiden durch Austausch des Initiormoleküls

Indem man das natürliche Initiormolekül blockiert und stattdessen eine künstlich synthetisierte Vorstufe verwendet, kann man strukturelle Variationen des Endprodukts erzeugen. Die übrige Polyketid-Synthese funktioniert genauso wie zuvor; jedes Modul addiert eine Untereinheit aus zwei, drei oder vier Kohlenstoffatomen und kann die Ketogruppe modifizieren. Die verschiedenen so entstehenden Endprodukte kann man dann auf eine verbesserte antibakterielle Wirkung hin überprüfen.

tenketten an der Polyketidkette erzeugen. Für solche gentechnischen Eingriffe überführt man das Gencluster für die Polyketid-Synthese normalerweise in *E. coli*. Es gibt drei Möglichkeiten, die Synthesemodule zu modifizieren:

1. Einzelne Module können direkt verändert werden, um eine Enzymwirkung zu inaktivieren oder in Gang zu setzen.
2. Die Module können komplett durch andere Module desselben Reaktionsweges aus demselben

Polyketid-produzierenden Organismus ersetzt werden.

- Man kann Module von Polyketid-Synthasen anderer Polyketid-produzierender Organismen einbauen.

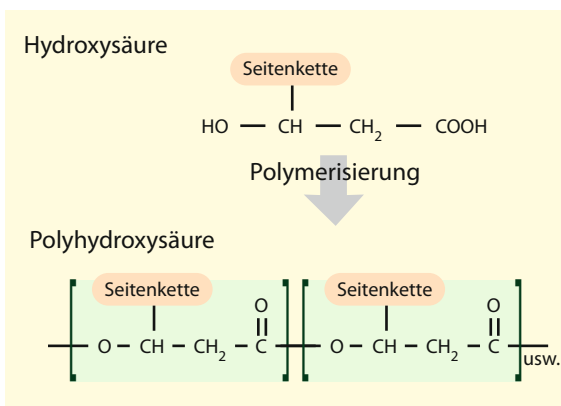
Bei sechs aufeinanderfolgenden Modulen ergibt sich ein enormes Potenzial für Veränderungen. Die modifizierten Polyketid-Gencluster kann man dann wieder in einen natürlichen Polyketidproduzenten wie *Streptomyces* einbauen oder in *E. coli* exprimieren. Nach Erstellung einer Bibliothek von Polyketiden lässt sich diese auf nützliche Eigenschaften analysieren.

Durch Neuordnung und Modifikation der Enzymmodule des Polyketidweges kann man eine große Zahl von Derivaten erzeugen. Diese Gruppe von Verbindungen enthält mehrere sehr nützliche Antibiotika wie Tetracycline und Erythromycin.

Auch biosynthetische Kunststoffe sind biologisch abbaubar

Kunststoffe sind kettenförmige Polymere aus monomeren Untereinheiten wie Proteinen und Nucleinsäuren. Die meisten Kunststoffe bestehen allerdings aus unendlichen Wiederholungen des gleichen Monomers. Mitunter werden auch zwei oder mehr nahe verwandte Monomere gemischt und nach dem Zufallsprinzip aneinandergereiht.

Bestimmte Bakterien synthetisieren und speichern eine Gruppe verwandter Kunststoffe, die **Polyhydroxyalkanoate (PHAs)** oder **Polyhydroxyfettsäuren**. Ihre Zusammensetzung zeigt Abbildung 13.23. Die Bakterien reichern PHAs an, wenn ihnen im Überschuss Kohlenstoff und Energie zur Verfügung stehen, andere essenzielle Nährstoffe wie Stickstoff oder Phosphor jedoch knapp sind. Sobald sich die Bedingungen verbessern, bauen sie die PHAs ab und nutzen sie als Energiequelle. Das am häufigsten vorkommende PHA besteht aus Untereinheiten mit vier C-Atomen (Hydroxybutyrat, HB) und wird daher als **Polyhydroxybutyrat (PHB)** bezeichnet. Ein Kunststoff, bei dem nach dem Zufallsprinzip 10–20 % Untereinheiten mit fünf C-Atomen (Hydroxyvalerat, HV) untergemischt wurden, zeichnet sich



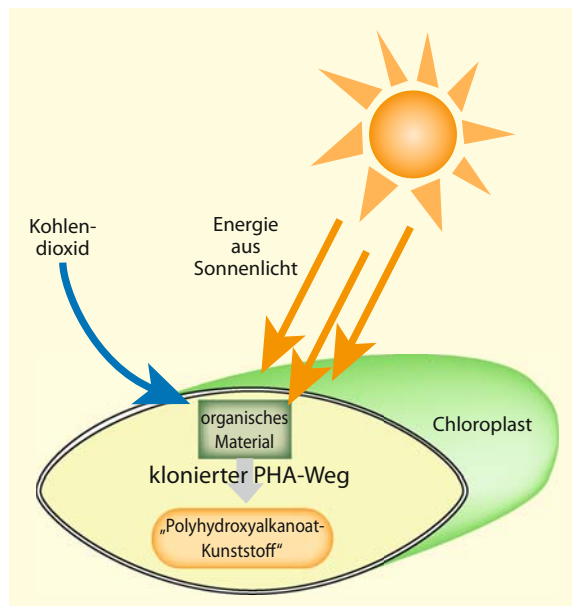
13.23 Struktur von Polyhydroxyalkanoat-Kunststoffen

Kunststoffe sind langkettige Moleküle aus sich wiederholenden Untereinheiten. In Polyhydroxyalkanoaten sind wiederholte Hydroxysäureuntereinheiten über ihre Carboxyl- und Hydroxylgruppen miteinander verknüpft. Durch die verschiedenen möglichen Seitenketten ändern sich letztendlich die Eigenschaften des Kunststoffs.

durch sehr viel bessere physikalische Eigenschaften aus. Wieder andere PHAs mit einem Anteil an Untereinheiten aus acht oder mehr C-Atomen ergeben ein mehr gummiartiges Material.

Mutierte Bakterien der Art *Alcaligenes eutrophus* stellen ein Poly-HB/HV-Copolymer her; dieses wird von der britischen Firma Zeneca Corporation unter dem Handelsnamen Biopol vermarktet. Dieses Polymer ist teurer als Kunststoffe aus Erdöl, aber vollständig biologisch abbaubar. Deshalb ist die Verwendung von PHAs derzeit auf spezielle Anwendungen beschränkt. Weil diese Polymere im Körper langsam zu natürlichen biochemischen Zwischenstufen abgebaut werden, kann man aus ihnen Kapseln herstellen, die über einen längeren Zeitraum ganz langsam ihren Inhalt freisetzen.

Um PHAs wirtschaftlich konkurrenzfähig zu machen, muss man sie kostengünstig in großen Mengen produzieren können. Dazu kann man beispielsweise die Gene für ihre Synthese in geeignete Nutzpflanzen einbauen. Es ist bereits gelungen, die Gene für PHA aus *Alcaligenes eutrophus* in die weit verbreitete genetische Modellpflanze *Arabidopsis* einzubauen, aber noch befindet sich das Ganze im Versuchsstadium. Die eingebauten PHA-Gene wurden so modifiziert, dass sie in den Chloroplasten von Pflanzen exprimiert werden (Abb. 13.24). Da in den Chloroplasten die Photosynthese stattfindet, erscheint neu synthetisiertes organisches Material zuerst hier. Durch Einbau des PHA-Weges in die Chloroplasten statt in



13.24 Expression des PHA-Weges in Pflanzen

Die enzymatischen Reaktionen zur Synthese von PHA wurden aus *Alcaligenes eutrophus* kloniert. Anschließend wurden die Gene in das Chloroplastengenom eingebaut, sodass die Enzyme nur in den Chloroplasten exprimiert werden. Die Enzyme machen sich das neu synthetisierte organische Material aus der Photosynthese zur Produktion von PHA zunutze.

das Hauptkompartiment der Pflanzenzellen lässt sich der PHA-Ertrag um das Hundertfache steigern. Als nächster Schritt soll der Syntheseweg in eine echte Nutzpflanze wie Raps oder Sojabohnen eingeführt werden. Damit wird der Begriff „Plastikblumen“ vielleicht eine ganz neue Bedeutung erlangen.

Das Kunststoffpolymer Polyhydroxybutyrat (PHB) kann von Bakterien oder gentechnisch veränderten Pflanzen synthetisiert werden. Bei verwandten Kunststoffen kann man durch entsprechende Modifikation gewünschte Eigenschaften erzielen; als zusätzliches Plus sind sie zudem biologisch abbaubar.

► Weiterführende Literatur

- Aldor IS, Keasling JD (2003) Process design for microbial plastic factories: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol* 14: 475–483
- Atkinson MR, Savageau MA, Myers JT, Ninfa AJ (2003) Development of genetic circuitry exhibiting toggle switch or oscillatory behavior in *Escherichia coli*. *Cell* 113: 597–607
- Cochet N, Widehem P (2000) Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 153–161
- Dien BS, Cotta MA, Jeffries TW (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 258–266
- Kern A, Tilley E, Hunter IS, Legisa M, Glieder A (2007) Engineering primary metabolic pathways of industrial microorganisms. *J Biotechnol* 129: 6–29
- Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, Laser M (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. An update. *Curr Opin Biotechnol* 16: 577–583
- McDaniel R, Weiss R (2005) Advances in synthetic biology: On the path from prototypes to applications. *Curr Opin Biotechnol* 16: 476–483
- Meyer A, Pellaux R, Panke S (2007) Bioengineering novel *in vitro* metabolic pathways using synthetic biology. *Curr Opin Microbiol* 10: 246–253
- Sandmann G, Römer S, Fraser PD (2006) Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab Eng* 8: 291–302
- Sato F, Inui T, Takemura T (2007) Metabolic engineering in isoquinoline alkaloid biosynthesis. *Curr Pharm Biotechnol* 8: 211–218
- Symons ZC, Bruce NC (2006) Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. *Nat Prod Rep* 23: 845–850
- Thykaer J, Nielsen J (2003) Metabolic engineering of beta-lactam production. *Metab Eng* 5: 56–69
- Urgun-Demirtas M, Stark B, Pagilla K (2006) Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. *Crit Rev Biotechnol* 26: 145–164
- Yoshikuni Y, Keasling JD (2007) Pathway engineering by designed divergent evolution. *Curr Opin Chem Biol* 11: 233–239
- Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 17–34

Transgene Pflanzen und Pflanzen- biotechnologie

Die Geschichte der Pflanzenzüchtung

Pflanzliche Gewebekulturen

Gentechnische Veränderungen an Pflanzen

Einbau von Genen in Pflanzen mit dem Ti-Plasmid

Einsatz von Partikelkanonen

Nachweis des Einbaus von DNA

Anwendung des Cre/*loxP*-Systems

Züchtung und Überprüfung von Pflanzen

Transgene Pflanzen mit Herbizidresistenz

Transgene Pflanzen mit Insektenresistenz

Trehalose in transgenen Pflanzen erhöht die Stresstoleranz

Funktionelle Genomik bei Pflanzen

Beurteilung der Sicherheit von Nahrungsmitteln und StarLink-Mais

Bt-Toxin und Schmetterlinge

Weiterführende Literatur

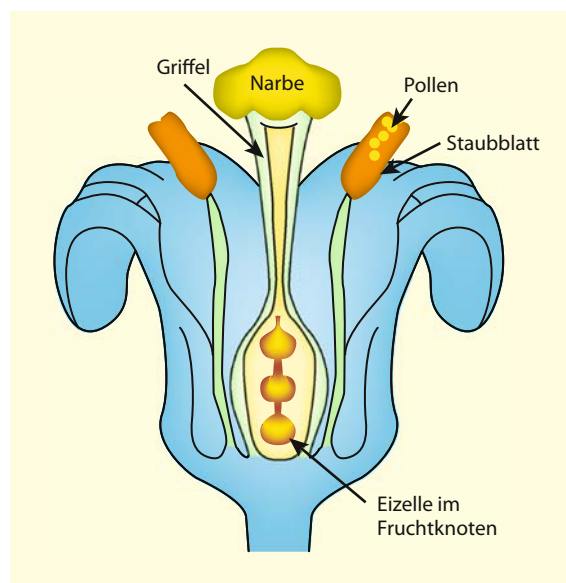
Die Geschichte der Pflanzenzüchtung

Schon seit Tausenden von Jahren versucht der Mensch, Nutzpflanzen und Nutztiere durch selektive Züchtung zu verbessern. Dies erfolgt überwiegend nach dem Prinzip von Versuch und Irrtum. Im Laufe der Zeit haben die Tier- und Pflanzenzüchter gelernt, dass die Verbesserung ihrer Nutztiere und -pflanzen eine biologische Grundlage hat. Schließlich experimentierte schon der Begründer der Genetik, Gregor Mendel, mit Erbsen. Er erforschte eindeutig beobachtbare Merkmale wie glatte oder runzelige Samen oder die Samenfarben Gelb und Grün. Dazu übertrug Mendel den Pollen einer Pflanze auf die Narbe einer anderen Pflanze (Abb. 14.1), führte also eine **Fremdbestäubung** durch. Mit seinen Experimenten zeigte er, dass einige Merkmale von Pflanzen über andere dominieren. So entstanden bei der Kreuzung von Erbsenpflanzen mit gelben Samen und solchen mit grünen Samen ausschließlich Pflanzen, die gelbe Samen hervorbrachten. Veröffentlicht hat Mendel diese Ergebnisse im Jahr 1865, aber erst lange nach seinem Tod wurde ihre Tragweite schließlich erkannt.

Zahlreiche Wissenschaftler in aller Welt bedienen sich nach wie vor dieser herkömmlichen Züchtungsmethoden, um die Erträge von Nutzpflanzen zu steigern, die Resistenz gegen Schädlinge oder Krankheiten zu erhöhen oder die Toleranz bestimmter Pflanzen gegen Hitze, Kälte, Trockenheit oder Feuchtigkeit zu verbessern. Zwar kann es durchaus gelingen, durch einfache Kreuzung zweier ertragreicher Pflanzen Tochterpflanzen zu erhalten, die noch höhere Erträge bringen als die Elternpflanzen, aber dieser Prozess ist langwierig und beschwerlich. Um tatsächlich eine Tochterpflanze mit höherem Ertrag zu erhalten, muss man Abertausende von Pflanzen fremdbestäuben. Die Bestäubungen müssen per Hand erfolgen, d.h. der Pollen einer Pflanze muss manuell auf eine andere übertragen werden. Die Aussicht, verbesserte Merkmale zu erhalten, ist zudem durch die in den Pflanzen bereits vorhandene genetische Vielfalt begrenzt. Sofern die gekreuzten Pflanzen also viele Gene gemeinsam haben, sind auch die möglichen Verbesserungen begrenzt. Weist eine Pflanze keine Gene gegen Krankheitsresistenz auf, so gibt es keine Möglichkeit, dieses Merkmal durch herkömmliche Fremdbestäubung zu erzeugen. Daher haben Wissenschaftler nach neuen, ein-

träglicheren Wegen zur Verbesserung von Nutzpflanzen gesucht.

In den 1920er-Jahren erkannten Wissenschaftler, dass man mit mutagenen Verbindungen oder durch Bestrahlung mit Röntgen- oder γ -Strahlen Mutationen in Samen auslösen kann. Mitunter lassen sich dadurch Erfolge erzielen, aber die Ergebnisse solcher Behandlungen sind noch weniger vorhersehbar als die traditioneller Züchtungsmethoden. Trotzdem gelang es, durch **Mutationszüchtung** Erfolge zu erzielen, vor allem auf dem Gebiet der Blumenzucht. So konnte man auf diese Weise bei Blumen wie Tulpen, Löwenmäulchen, Rosen, Chrysanthemen und vielen anderen neue Blütenfarben und eine höhere Zahl von Blütenblättern erzielen. Auch an Gemüse-, Obst- und anderen Nutzpflanzen hat man die Mutationszüchtung ausprobiert. Manche Sorten unserer heutigen Lebensmittel sind auf diese Weise entstanden. Kurz gesagt, setzt man dazu eine große Zahl von Samen dem Mutagen aus und erzeugt so Mutationen in deren DNA. Die Samen werden dann ausgesät und die Sämlinge aufgezogen.



14.1 Die Fortpflanzungsorgane einer typischen Pflanze

Die männlichen Fortpflanzungszellen der Pflanze sind die Pollenkörner. Diese werden in den Antheren oder Staubbeutel (orange) am Ende der Staubblätter produziert. Die weiblichen Fortpflanzungszellen, die Eizellen, werden im Fruchtknoten gebildet. Über die Narbe gelangen die Pollenkörner durch den Griffel zu den Eizellen im Fruchtknoten.

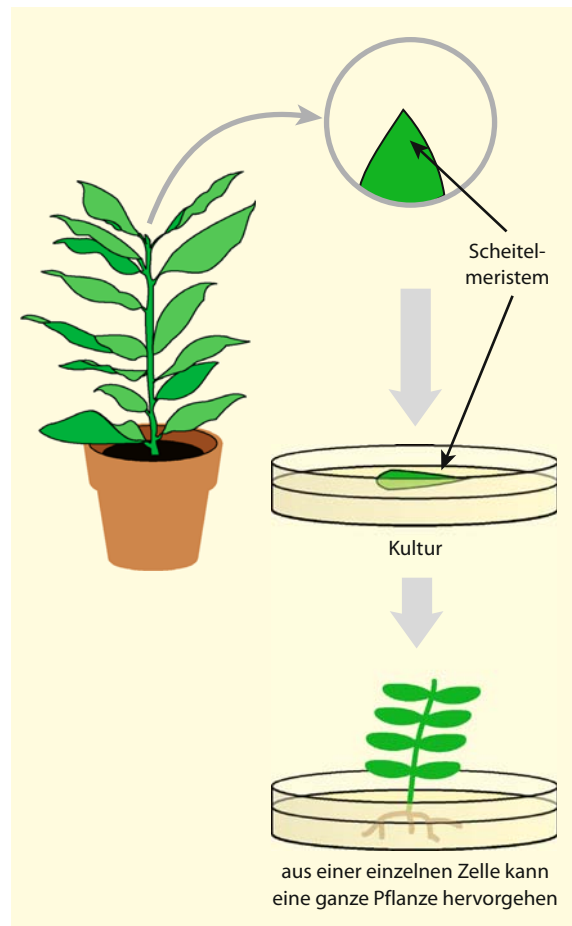
Allerdings wird die Mehrzahl der Samen durch diese Behandlung abgetötet. Nach Aufzucht der lebensfähigen Samen überprüft man die Früchte, Blüten oder Ähren der Pflanzen auf Verbesserungen. Findet man eine Pflanze mit einem erwünschten Merkmal, dann schaut man, ob auch ihre Nachkommen dieses Merkmal aufweisen. Neue Merkmale sind nur dann von Nutzen, wenn sie **erblich** sind, also von einer Generation zur nächsten weitergegeben werden. Weil durch eine solche Behandlung nur eine einzige Ausgangspflanze ein bestimmtes erwünschtes Merkmal erlangt, muss man diese Pflanze über einen langen Zeitraum vermehren, bevor man die geernteten Früchte, Getreide oder Blumen vermarkten kann. Auf jeden Fall sollte man sich vergegenwärtigen, dass die an die Konsumenten verkauften Früchte oder Blumen selbst niemals dem Mutagen ausgesetzt waren. Auch heute werden noch chemische Mutagene eingesetzt. Man identifiziert jedoch mithilfe molekularbiologischer Techniken, welches Gen für den gewünschten Phänotyp verantwortlich ist (s. unten).

Die Entwicklung der Molekularbiologie hat in jüngerer Zeit die Möglichkeit eröffnet, Nutzpflanzen auf eine sehr viel vorhersehbarere Weise zu verbessern. So haben Wissenschaftler herausgefunden, wie man Gene aus anderen Quellen in bestimmte Pflanzen überführen und so **transgene Pflanzen** erzeugen kann. Die Fremdgene oder **Transgene** können beispielsweise eine Resistenz gegenüber bestimmten Insekten bewirken, den Pflanzen Schutz vor einem bestimmten Herbizid bieten oder den Vitamingehalt der Pflanzen erhöhen. Der größte Unterschied zwischen der Erzeugung transgener Pflanzen und der herkömmlichen Pflanzenzüchtung besteht darin, dass man eine Pflanze mit einem Gen aus einer beliebigen Quelle transformieren kann – also nicht nur mit Genen aus anderen Pflanzen, sondern auch mit Genen aus Tieren, Bakterien oder Viren. Herkömmliche Methoden zur Fremdbestäubung erlauben lediglich den Austausch von Genen zwischen Vertretern einer bestimmten Pflanzengattung. Zudem kennt man die Funktion des Transgens und hat dieses genau überprüft, bevor man es in die Pflanze einführt. Bei der herkömmlichen Züchtung ist die Identität der Gene, die eine Verbesserung der Nutzpflanzen bewirken, nur in den seltensten Fällen bekannt.

Transgene Pflanzen enthalten Fremdgene, sogenannte Transgene, die ein erwünschtes Merkmal hervorbringen.

Pflanzliche Gewebekulturen

Zu den großen Vorteilen von Pflanzen zählt, dass man sie häufig aus einer einzelnen Zelle regenerieren kann. Jede Pflanzenzelle ist also **totipotent**, hat die Fähigkeit, sich zu jedem Zelltyp der ausgewachsenen Pflanze zu differenzieren (Abb. 14.2). Anders als bei Tieren gibt es somit bei Pflanzen keine absolute Trennung zwischen Keimbahnzellen und somatischen Zellen. Dieses einzigartige Merkmal ermöglicht Wissenschaftlern, Pflanzenzellen in Kultur zu züchten und zu manipulieren und aus diesen kultivierten Zellen vollständige Pflanzen zu erzeugen.



14.2 Aus einer einzelnen Pflanzenzelle kann eine vollständige Pflanze regeneriert werden

Kleine Gewebeproben oder sogar einzelne Pflanzenzellen lassen sich *in vitro* kultivieren. Unter geeigneten Bedingungen kann daraus wieder eine vollständige Pflanze hervorgehen.

Gewebekulturen von Pflanzen kann man entweder auf einem festen Medium in einer Petrischale als sogenannte **Kalluskultur** erzeugen oder in einer Flüssigkeit als **Suspensionskultur**. In beiden Fällen muss der betreffenden Pflanze ein Stück lebendes Gewebe entnommen werden, das sogenannte **Explantat**. Für eine Kalluskultur kann das Gewebe ein unreifer Embryo, ein Stück Apikal- oder Scheitelmeristem (aus der Wachstumsregion von Pflanzenschösslingen) oder eine Wurzelspitze sein. Für eine Suspensionskultur müssen die einzelnen Zellen dissoziiert werden. Normalerweise verwendet man für Flüssigkulturen **Protoplasten** (Pflanzenzellen, deren Zellwand aufgelöst wurde), Mikrosporen (unausgereifte Pollenzellen) oder Makrosporen (unausgereifte Eizellen). Diese Zellen werden dann in einem Gemisch aus Nährstoffen und bestimmten Pflanzenhormonen, die ein Wachstum der undifferenzierten Zellen auslösen, kultiviert.

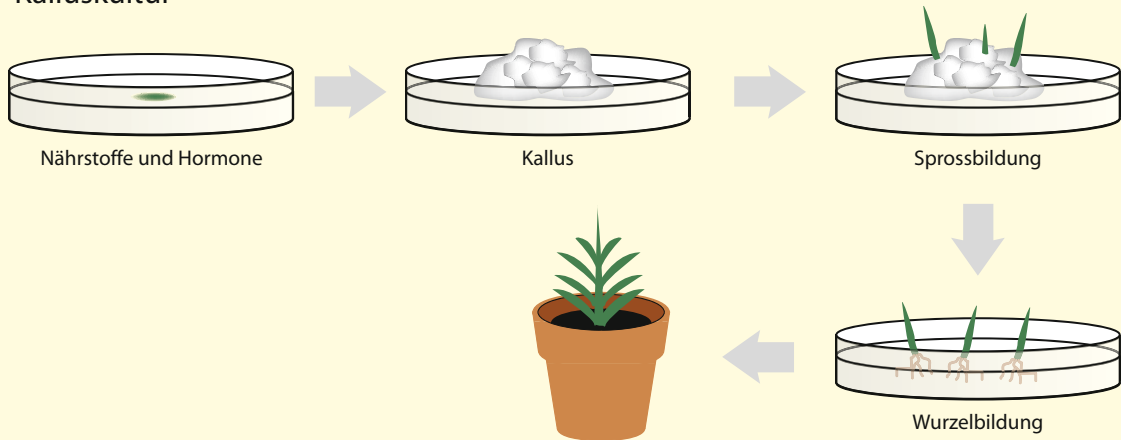
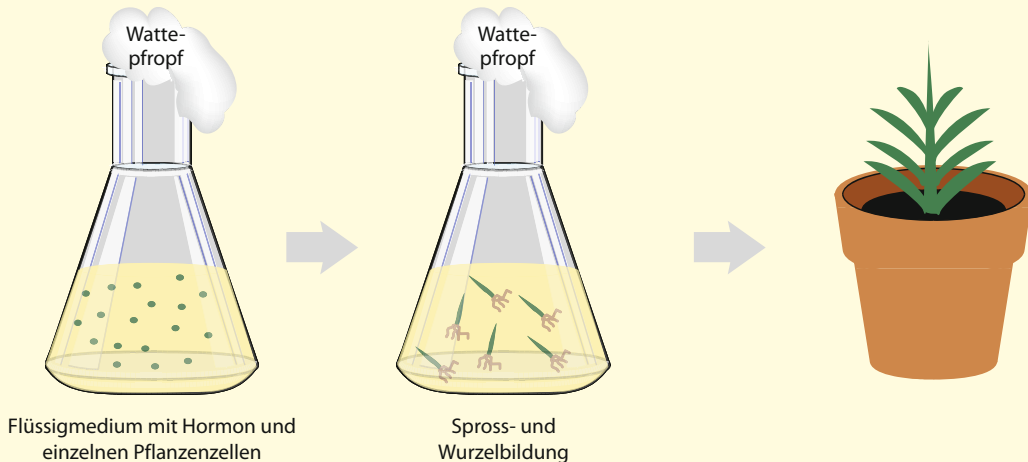
Verschiedene Pflanzentypen reagieren auf unterschiedliche Hormone. Für eine Kultur von Weizenzellen züchtet man das Explantat beispielsweise mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D). Das ist ein Analogon des Pflanzenhormons Auxin, das zu Dedifferenzierung und Wachstum anregt. Beim Kultivieren von Tomatenpflanzen dient das Hormon Cytokinin zur Dedifferenzierung der Zellen und löst die Zellteilung aus. Bei einer Kalluskultur bilden die undifferenzierten Zellen auf einem festen Medium eine kristalline weiße Schicht, den sogenannten **Kallus**. Nach etwa einem Monat Wachstum kann man die Masse aus undifferenzierten Zellen in ein Medium mit geringerer Hormonkonzentration oder in ein Medium, das ein anderes Hormon enthält, überführen. Durch die Verringerung der Hormonmenge können sich einige der undifferenzierten Kalluszellen zu Pflanzensprossen entwickeln. In den meisten Fällen sehen die kleinen Schösslinge aus wie Grashalme, die aus der Zellmasse herauswachsen. Nach weiteren 30 Tagen wird das Hormon gänzlich entfernt. Dadurch beginnen bei einigen der Schösslinge Wurzelhärchen zu wachsen. Weitere 30 Tage später kann man kleine Pflänzchen entnehmen und in Erde einpflanzen. Auch bei der Suspensionskultur regt man das Wachstum der undifferenzierten Zellen durch Hormone an, aber hier bilden sich Spross- und Wurzelgewebe gleichzeitig (Abb. 14.3).

Weil man mithilfe der Gewebekultur aus einer Quelle zahlreiche Pflanzen produzieren kann, eignet sich diese Technik dazu, Klone einer bestimmten Pflanze zu erzeugen. So kann man beispielsweise eine als sehr selten eingestufte Pflanze mittels Gewebe-

kultur vermehren. Man benötigt nur einen einzigen Steckling, um zahlreiche identische Nachkommen zu erzeugen. Bestimmte Pflanzensorten, die sich über die Produktion von Samen kaum erhalten lassen, kann man in einer Gewebekultur über einen längeren Zeitraum kultivieren. Auch für die Mutationszüchtung hat man Zellkulturen angelegt. Anstelle von Samen werden hierbei die undifferenzierten Zellen dem Mutagen ausgesetzt und die Pflanzen dann aus den mutagenisierten Zellen gezüchtet. Auf die exponierten Zellen eines Kallus zeigen Mutagene eine effektivere Wirkung als auf Zellen, die in einem Samen abgeschirmt sind.

Das Züchten von Pflanzen in einer Gewebekultur kann alleine schon Mutationen auslösen. Bei der Regeneration einer Pflanze aus einer einzigen Zelle sind drei verschiedene Veränderungen möglich. Beispielsweise können in der regenerierten Pflanze zeitweilig physiologische Veränderungen auftreten. Durch Gewebekultur regenerierte Heidelbeersträucher sind zum Beispiel viel niedriger. Diese Veränderungen sind jedoch nicht von Dauer. Wenn die regenerierten Heidelbeersträucher einige Jahre in der Natur gewachsen sind, unterscheiden sie sich nicht mehr von anderen Heidelbeersträuchern. Weiterhin kann eine **epigenetische Veränderung** auftreten. Eine solche Veränderung bleibt während der gesamten Lebensspanne der regenerierten Pflanze erhalten, wird jedoch nicht an die nächste Generation weitergegeben. Epigenetische Veränderungen sind häufig auf eine veränderte DNA-Methylierung zurückzuführen (s. Kap. 4). Echte **genetische Veränderungen** schließlich betreffen die regenerierte Pflanze und alle ihre Nachkommen. Sie können von einer Änderung des Ploidiegrades, einer Neuordnung der Chromosomen, von Punktmutationen, einer Aktivierung transponierbarer Elemente oder von Änderungen des Chloroplasten- oder Mitochondriengenoms herühren. Derartige Veränderungen sind relativ häufig. Schwankungen der verfügbaren Nährstoffe und Hormone in der Gewebekultur können die Mutationshäufigkeit jedoch stark verringern.

Da Pflanzenzellen totipotent sind, kann man normale pflanzliche Gewebe in Kultur züchten. In einer Kallus- oder Suspensionskultur werden aus undifferenzierten Pflanzenzellen durch Veränderung der Hormonkonzentrationen kleine Pflanzen gezogen. Pflanzliche Gewebekulturen können verschiedene Veränderungen auslösen: echte genetische Veränderungen, epigenetische und physiologische.

a Kalluskultur**b Suspensionskultur****14.3 Durch Kallus- oder Suspensionskultur von Pflanzenzellen lassen sich vollständige neue Pflanzen erzeugen**

Bei der Kalluskultur wächst eine Masse undifferenzierter Zellen auf einem festen Medium. In einer Suspensionskultur werden aufgetrennte Einzelzellen gezüchtet. In beiden Kulturen entwickeln sich Sprosse und Wurzeln, sofern die Mengen der Pflanzenhormone richtig justiert sind.

Gentechnische Veränderungen an Pflanzen

Als ersten Schritt bei der gentechnischen Veränderung einer Pflanze muss man ein Gen identifizieren, mit dem man ein bestimmtes erwünschtes Merkmal auf die Pflanze übertragen kann. In gewisser Hinsicht ist dies der schwierigste Teil der Gentechnik.

Zu den wünschenswertesten Merkmalen einer Nutzpflanze zählt die Steigerung des Kornertrags oder des Ertrags anderer Pflanzenteile. Ebenfalls sehr vorteilhaft ist eine erhöhte Resistenz gegen Krankheiten oder Trockenheit. Die dafür verantwortlichen Gene zu finden, gestaltet sich recht schwierig, denn solche Merkmale werden zumeist von mehreren in Wechselwirkung stehenden Genen gesteuert. Zusätzlich können solche Gene noch weitere Funktionen im

Rahmen der Pflanzenentwicklung und Physiologie erfüllen.

Bei den bislang erfolgreichsten gentechnischen Eingriffen in Pflanzen wurden ein Gen oder einige wenige Gene eingebaut, die einfache, aber nützliche Eigenschaften vermitteln. So ist beispielsweise die Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat auf ein einzelnes Gen zurückzuführen. Gelingt es, Nutzpflanzen wie Sojabohnen resistent gegen Glyphosat zu machen, so kann ein Farmer sämtliche auf den Feldern wachsende Unkräuter vernichten, ohne dabei seine Sojabohnen zu schädigen (s. unten). Ein weiteres erwünschtes Merkmal, das ebenfalls häufig seine Ursache in einem einzelnen Gen hat, ist die Produktion von Toxinen, die Schadinsekten abtöten (s. unten). In beiden Fällen stammen die entsprechenden Transgene aus Bakterien. Durch weitere Erforschung der Pflanzenphysiologie wird man noch mehr Gene entdecken, die den Wert von Nutzpflanzen erhöhen. So hat man beispielsweise bei Reis einen von zwei Genen gesteuerten Reaktionsweg eingeführt, durch den der Reis widerstandsfähiger gegen Trockenheit wird (s. unten).

Man kann Pflanzen auch so verändern, dass neue Produkte entstehen. Goldener Reis exprimiert zum Beispiel den Biosyntheseweg für Vitamin-A-Vorstufen. Entwickelt wurde dieser Reis für Menschen, für die Reis die Hauptnahrungsquelle darstellt. Durch den Zusatz der Vitamin-A-Vorstufen lässt sich ein Mangel an Vitamin A vermeiden, der bei Kindern in Entwicklungsländern zum Erblinden führen oder gar tödlich enden kann. Wissenschaftler haben auch das menschliche Insulingen zur Expression in *Arabidopsis* und Safran eingebaut. Gegenwärtig wird Insulin von gentechnisch modifizierten Bakterien (s. Kap. 19) produziert. Von Pflanzen synthetisiertes Insulin lässt sich jedoch leichter in großen Mengen isolieren und reinigen und sollte auch sehr viel kostengünstiger sein. Bei weiteren Forschungen wird man auch noch auf weitere neue Gene und nützliche Synthesewege stoßen, die man in Pflanzen einbauen kann. Vielleicht werden gentechnisch modifizierte Pflanzen eines Tages zur Reinigung von Kontaminationen mit Erdöl und anderen Schadstoffen dienen, indem man sie einfach auf dem kontaminierten Boden anbaut.

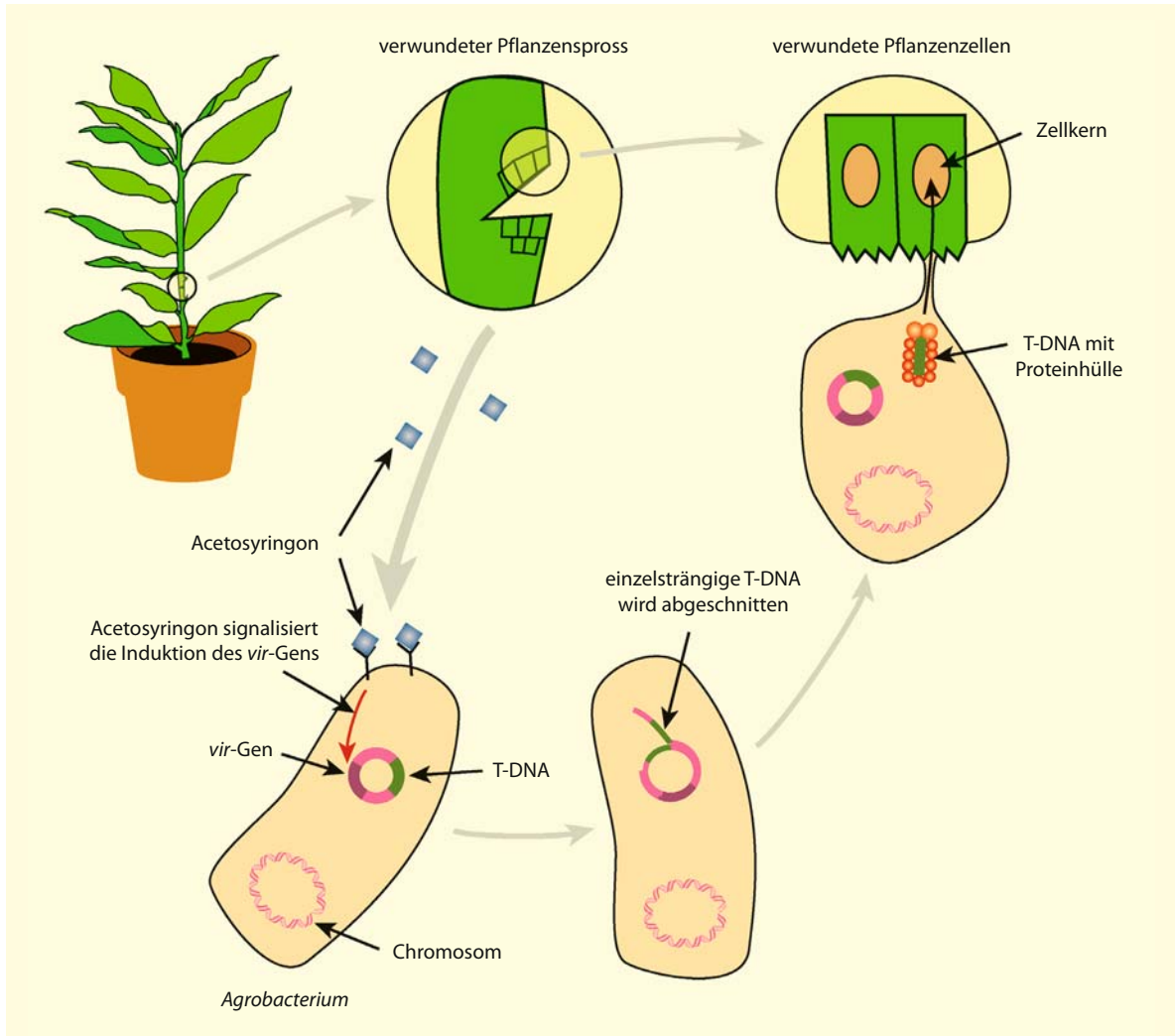
Ein Gen mit einem bestimmten vorteilhaften Merkmal zu finden, ist der erste und zugleich wichtigste Schritt bei der gentechnischen Veränderung von Pflanzen.

Einbau von Genen in Pflanzen mit dem Ti-Plasmid

Auch Pflanzen leiden unter Tumoren, die sich allerdings stark von den Krebstumoren bei Tieren unterscheiden. Die häufigste Ursache für Tumorbildung ist das Ti-Plasmid (Tumor-induzierendes Plasmid), das von Bodenbakterien der *Agrobacterium*-Gruppe übertragen wird. Speziell das Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* hat sich als wichtiges Werkzeug für gentechnische Veränderungen an Pflanzen erwiesen. Der wesentlichste Aspekt bei der Infektion ist die Übertragung eines bestimmten Abschnitts der Ti-Plasmid-DNA vom Bakterium auf die Pflanze. Diesen Transfer haben sich Wissenschaftler zunutze gemacht, um Gene mit erwünschten Eigenschaften in Pflanzenzellen einzuschleusen. *Agrobacterium* verfügt über die einzigartige Fähigkeit, einen Abschnitt seiner DNA in einen Vertreter eines anderen Reiches zu übertragen. Die meisten anderen DNA-Transfers erfolgen nur zwischen nahe verwandten Organismen.

In der Natur wird *Agrobacterium* von Pflanzen mit kleineren Wunden durch phenolische Verbindungen wie Acetosyringon angezogen, die durch die Wunde abgegeben werden (Abb. 14.4). Diese Verbindungen veranlassen die Bakterien, sich zur Pflanze hin zu bewegen und sich über verschiedene Oberflächenrezeptoren an sie zu heften. Die gleichen Induktoren aktivieren auch die Expression der Virulenzgene auf dem Ti-Plasmid, die für den Transfer der DNA auf die Pflanze zuständig sind. Das Ganze steht unter der Kontrolle eines Zweikomponenten-Regulationssystems (s. Kap. 2). An der Zelloberfläche wird der Sensor VirA autophosphoryliert, wenn er die pflanzliche Phenolverbindung registriert. Anschließend überträgt VirA das Phosphat auf das DNA-bindende Protein VirG, welches die Transkription der *vir*-Gene des Ti-Plasmids aktiviert. Zwei der Genprodukte (VirD1 und VirD2) kappen die flankierenden Sequenzwiederholungen von der T-DNA, und es entsteht ein einzelsträngiger, unreifer T-Komplex. VirD2 heftet sich dann an das 5'-Ende der T-DNA an, und bakterielle Helicasen entwinden die T-DNA vom Plasmid. Nun wird die einzelsträngige Lücke auf dem Plasmid repariert und die T-DNA mit dem VirE2-Protein umhüllt, sodass ein hohles zylindrisches Filament mit verdrehter Struktur entsteht. Das ist die reife Form der T-DNA, die in die Pflanzen übertragen wird.

Der Prozess der Übertragung der T-DNA in die Pflanze ähnelt der bakteriellen Konjugation. Zunächst



14.4 *Agrobacterium* überträgt Plasmid-DNA auf infizierte Pflanzen

Agrobacterium, das ein Ti-Plasmid trägt, wird von Acetosyringon zur einem verwundeten Pflanzenspross gelockt. Das Ti-Plasmid wird von Endonucleasen gespalten und setzt eine einzelsträngige T-DNA frei, die von Schutzproteinen umhüllt ist und durch einen Konjugations-ähnlichen Mechanismus in die Pflanzenzelle übertragen wird. Nach Eindringen in den Zellkern baut sich die T-DNA in die chromosomale DNA der Pflanze ein.

bildet *Agrobacterium* einen Pilus. Diese stäbchenförmige Struktur stellt eine Verbindung mit der Pflanzenzelle her und eröffnet einen Kanal, durch den die T-DNA aktiv in das Cytoplasma der Pflanze transportiert wird. Sowohl der Pilus als auch der Transportkomplex bestehen aus Proteinen, die Produkte des *vir*-Gens sind. Nach Vordringen in das pflanzliche Cytoplasma wird die T-DNA in den Zellkern importiert. VirE2 und VirD2 verfügen jeweils über Signale zur Kernlokalisierung, die von cytosolischen Protei-

nen der Pflanze erkannt werden. Diese Proteine transportieren den T-Komplex zum Zellkern, wo er aktiv durch eine Kernpore transportiert wird. Dort wird der einzelne T-DNA-Strang direkt in das pflanzliche Genom eingebaut und in eine doppelsträngige Form umgewandelt. Für den Einbau sind DNA-Ligase, Polymerase und Chromatin-remodeling-Proteine erforderlich, welche die Pflanze zur Verfügung stellt.

Wenn die Gene der T-DNA erst einmal Teil des pflanzlichen Genoms sind, werden sie exprimiert.

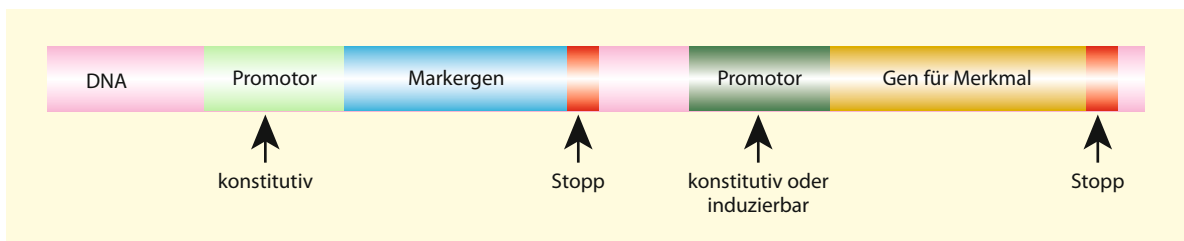
Diese Gene haben Eukaryoten-ähnliche Promotoren, Transkriptions-Enhancer und Poly(A)-Sequenzen und werden daher im Zellkern der Pflanze und nicht im Herkunftsbakterium exprimiert. Die von ihnen codierten Proteine synthetisieren die beiden Pflanzenhormone Auxin und Cytokinin. Auxin bewirkt eine Vergrößerung von Pflanzenzellen, Cytokinin ihre Teilung. Die infizierten Pflanzenzellen beginnen rasch und unkontrolliert zu wachsen, was letztendlich zur Bildung eines Tumors führt.

T-DNA trägt auch Gene für die Synthese von Opinen, verschiedene aus Aminosäuren und Zuckerphosphaten abgeleitete Derivate. Durch den Typ des Opins unterscheiden sich die verschiedenen Stämme von *Agrobacterium*. Hergestellt werden die Opine von Pflanzenzellen, die T-DNA enthalten, verwertet werden sie jedoch von den Bakterien als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequellen. Interessant ist, wie das Bakterium die Pflanze überlistet, unter Verbrauch ihrer eigenen Ressourcen das Bakterium mit Nahrung zu versorgen. Das Ti-Plasmid, das sich nach wie vor im *Agrobacterium* befindet, trägt Gene, die den Bakterien die Aufnahme dieser Opine und deren Abbau zu Nahrungszwecken ermöglichen. Man beachte, dass andere Bakterien, die vielleicht per Zufall ebenfalls vorhanden sind, die Opine nicht nutzen können, da sie keine Gene für deren Aufnahme und Metabolismus besitzen. Dies gewährleistet, dass die Pflanze ausschließlich Bakterien mit dem Ti-Plasmid ernährt.

Wie werden nun aber die Ti-Plasmide zur Verbesserung von Pflanzen eingesetzt? Zunächst werden die Ti-Plasmide „entwaffnet“, indem man die Gene für die Pflanzenhormone und die Opinsynthese aus der T-DNA herauschneidet. Anschließend wird das interessierende Transgen, etwa das Gen für ein Insektengift, in die T-DNA-Region des Ti-Plasmids

eingebaut. Durch Entfernen von Genen, die nicht am Transport der T-DNA beteiligt sind, wird das Ti-Plasmid noch weiter rationalisiert. Mit solchen kleineren Plasmiden lässt sich viel leichter arbeiten, und sie können in *Escherichia coli* einfacher manipuliert werden als in ihrem eigentlichen Wirt *Agrobacterium*. Wenn nun die T-DNA in die Pflanzenzelle gelangt und sich in deren Chromosom einbaut, überträgt sie das Transgen, verursacht aber keine Tumorbildung.

Damit das Transgen richtig funktionieren kann, muss die übertragene Region des Plasmids noch weitere Elemente enthalten (Abb. 14.5). Für die Expression des Transgens ist ein Promotor erforderlich, der effizient in Pflanzenzellen funktioniert. Davon gibt es zwei verschiedene Typen. Ein **konstitutiver Promotor** schaltet das Gen in allen Pflanzenzellen während der Entwicklung an; daher wird jedes Gewebe, selbst Frucht oder Samen, das Gen exprimieren. Noch raffinierter ist der Einbau eines **induzierbaren Promotors**, der sich ein und ausschalten lässt. Ein Beispiel hierfür ist der *cab*-Promotor des Gens, das für das Chlorophyll *a/b*-bindende Protein codiert. Dieser Promotor wird nur dann angeschaltet, wenn die Pflanze Licht ausgesetzt ist; daher wird dieses Gen in Wurzelgewebe und in Knollen wie Kartoffeln nicht exprimiert. Man kann zwar viele verschiedene Promotoren verwenden, im Idealfall sollte der Promotor jedoch nur in den Geweben angeschaltet werden, in denen die Transgenfunktion benötigt wird. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der genetisch modifizierten T-DNA-Region ist eine Art selektierbarer Marker. Mittels eines Resistenzgens gegen Herbizide oder Antibiotika in der T-DNA-Region kann man verfolgen, ob die Fremd-DNA tatsächlich in die Pflanzenzellen eingebaut wurde. Der selektierbare Marker kann Probleme verursachen, denn er muss in der gesamten Pflanze konstitutiv exprimiert werden.



14.5 Essenzielle Elemente für den Transport eines Transgens auf einem Ti-Plasmid

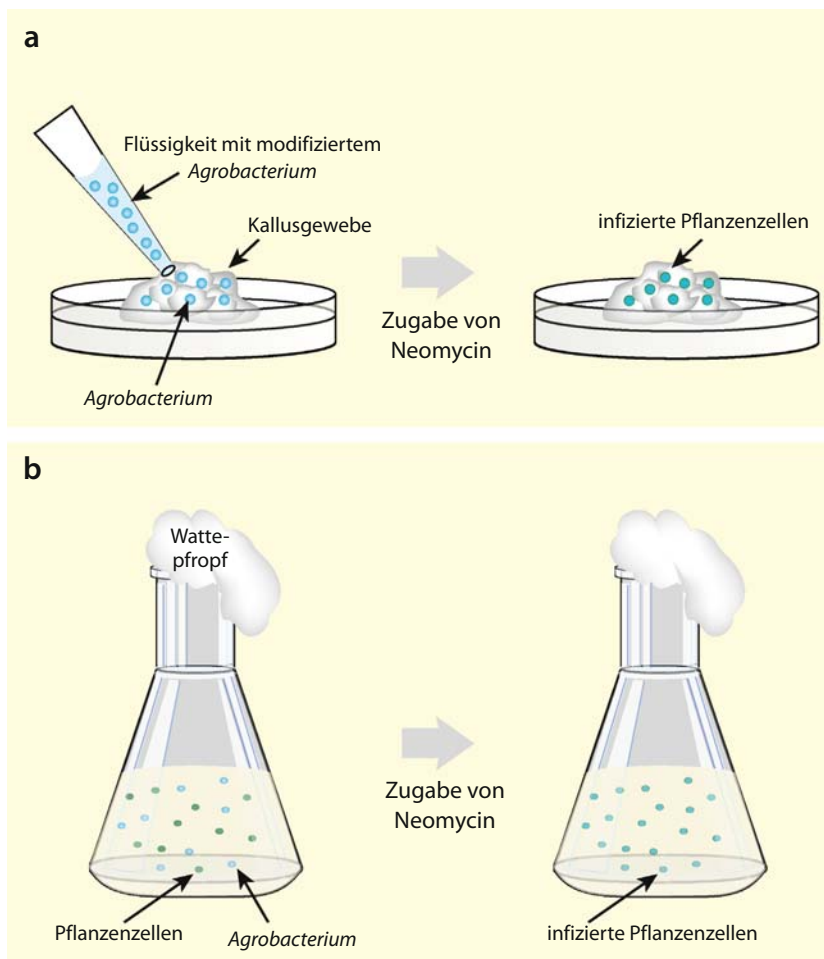
Der T-DNA-Abschnitt enthält sowohl ein Transgen als auch einen selektierbaren Marker oder Reportergen. Diese haben separate Promotoren und Terminationssignale. Marker oder Reportergen müssen kontinuierlich exprimiert werden, während das Transgen oft nur in bestimmten Geweben oder unter bestimmten Bedingungen exprimiert und gewöhnlich durch einen Promotor reguliert wird. Diesen kann man durch entsprechende Signale anschalten.

Viele Menschen befürchten, das Proteinprodukt des selektierbaren Markers könne Allergien oder ähnliche Reaktionen hervorrufen, wenn es in Früchten, Getreide oder Gemüse exprimiert wird. Es gibt jedoch Methoden, dieses Gen wieder zu entfernen, wenn die transgene Pflanze erst einmal isoliert ist (s. unten).

In der Praxis wird *Agrobacterium* dazu verwendet, interessante Gene in Pflanzen mithilfe der Gewebekultur zu übertragen. Dazu kultiviert man entweder dissoziierte Pflanzenzellen (*Protoplasten*) oder ein Stück Kallus mit *Agrobacterium*, das ein Ti-Plasmid mit modifizierter T-DNA enthält. Nach der gemeinsamen Kultur werden die Pflanzenzellen geerntet und zusammen mit dem als Selektionsmarker verwendeten Herbizid oder Antibiotikum inkubiert. Dadurch werden alle Zellen abgetötet, die nicht mit der T-DNA transformiert wurden oder die Gene auf der T-DNA nicht exprimieren. Durch Verände-

rung der Hormonbedingungen im Medium (wie bereits beschrieben) können die transformierten Zellen dann induziert werden, Spross- und Wurzelgewebe zu bilden (Abb. 14.6). Die kleinen transgenen Pflänzchen kann man anschließend daraufhin untersuchen, in welchem Umfang das Transgen exprimiert wurde (s. unten).

Vor einiger Zeit wurde eine Methode für die **in planta-Transformation mit *Agrobacterium*** entwickelt, welche die Transformation von Pflanzen revolutioniert hat. Die *in planta*-Transformation wird auch als **Floral-dip-Methode** bezeichnet. Entwickelt wurde die Methode an der Modellpflanze *Arabidopsis*, später aber auf andere Pflanzen wie Weizen und Mais ausgedehnt. Zunächst werden dazu *Arabidopsis*-Pflanzen gezüchtet, bis sie beginnen, Blütenknospen auszubilden. Diese Knospen werden jeweils entfernt und können sich innerhalb einiger Tage erneut bilden. Nach der Bildung neuer Knospen taucht man



14.6 Transfer eines modifizierten Ti-Plasmids in eine Pflanze

Pflanzlichem Gewebe in einer Gewebekultur wird *Agrobacterium* mit einem Ti-Plasmid zugefügt. Die T-DNA trägt ein Gen für Antibiotikaresistenz (in diesem Fall gegen Neomycin), was eine Selektion erfolgreich transformierter Pflanzenzellen ermöglicht. Hierfür kann man wahlweise eine Kalluskultur (**a**) oder eine Suspensionskultur (**b**) verwenden.

die Pflanzen in eine Suspension von *Agrobacterium*, die eine oberflächenaktive Substanz enthält. Diese oberflächenaktive Substanz ermöglicht *Agrobacterium*, sich an die Pflanze anzuheften und seine T-DNA zu übertragen. Weil sich die Blütenknospen gerade erst ausbilden, wird die T-DNA irgendwie über das Gewebe des Fruchtknotens zu einem Bestandteil der Keimbahn. Danach lässt man die Pflanze ihr Wachstum beenden und Samen bilden. Diese Samen werden dann geerntet und in Selektivmedium gezüchtet, um herauszufinden, welche davon die T-DNA eingebaut und exprimiert haben. Mit dieser Methode erhält man zwar nur einen geringen Anteil an Transformanten, man kann jedoch so viele Samen überprüfen, dass diese Prozedur dennoch gut funktioniert.

Bakterien der Gattung *Agrobacterium* infizieren verwundete Pflanzen, überführen ein Ti-Plasmid in die Pflanzenzelle und übertragen daraus den T-DNA-Anteil in das Pflanzengenom. Die Bakterien tricksen die Pflanze aus, ihre eigene Zuckerquelle zu erzeugen, und induzieren dann die Bildung eines Tumors.

Zur Erzeugung von transgenen Pflanzen wird ein Fremdgen in das Ti-Plasmid von *Agrobacterium* eingebaut; anschließend lässt man die Bakterien ihre T-DNA in das Pflanzengenom übertragen.

Mittels der *in planta*-Transformation mit *Agrobacterium* oder Floral-dip-Methode kann man transgene Pflanzen durch Einbau von T-DNA in regenerierende Pflanzengewebe erzeugen.

Einsatz von Partikelkanonen

Mit einer sogenannten Partikelkanone oder Genkanone lassen sich ebenfalls interessierende Gene in Pflanzengewebe einbringen; hierbei wird die DNA durch die pflanzlichen Zellwände geschossen. Im Gegensatz zum Ti-Plasmid-Transfer mit *Agrobacterium* funktioniert diese Methode bei allen Pflanzen. Grundlage dieser sogenannten biolistischen Methode bilden mikroskopisch kleine Metallpartikel als Träger der DNA. Diese werden mittels einer Partikelkanone in das Pflanzengewebe gefeuert und durchdringen die pflanzlichen Zellwände. Obwohl diese Technik recht unspezifisch ist, wurde sie mit großem Erfolg in der Pflanzenwelt eingesetzt.

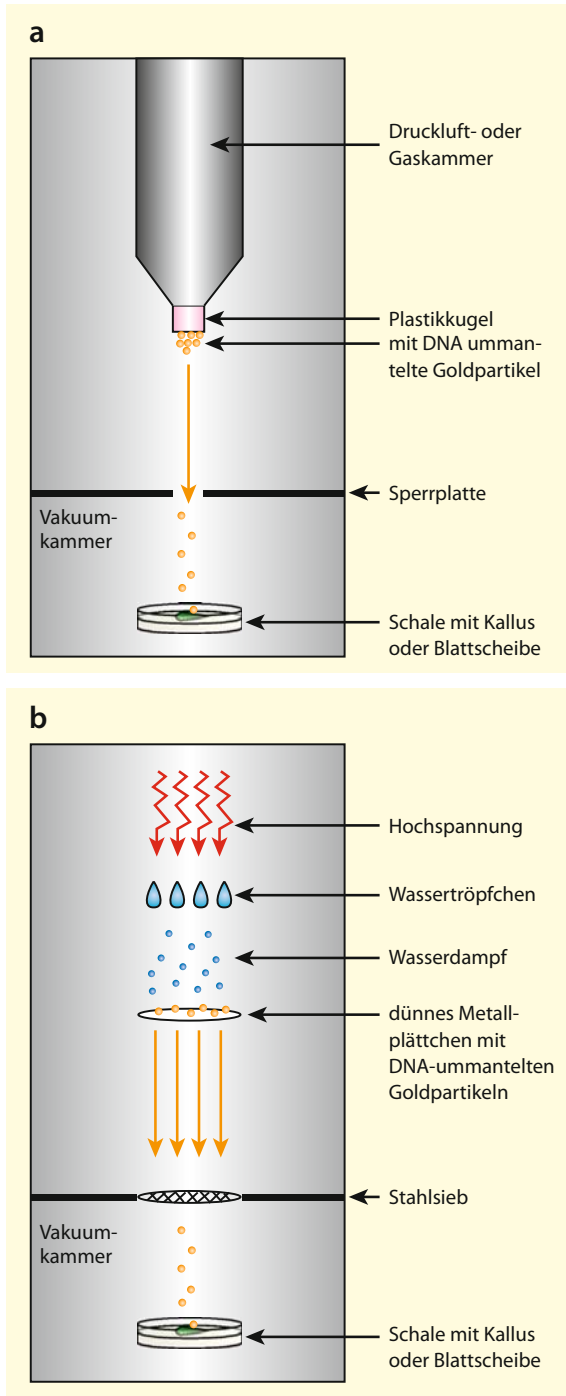
Zunächst isoliert man eine Blattscheibe (ein rundes Stück Blattgewebe) oder ein Stück Kallus der Pflanze und gibt dies in einer Schale in eine Vaku-

umkammer. Mit der zu übertragenden DNA (die das interessierende Gen trägt sowie alle erforderlichen Promotor- und Enhancer-Elemente plus selektierbare Marker) werden mikroskopisch kleine Gold- oder Wolframpartikel ummantelt. Goldpartikel sind dabei vorzuziehen, weil Wolfram für einige Pflanzen toxisch ist. Mit diesen Partikeln am Ende eines Plastikprojektils wird die Probe mittels Druckluft oder Helium beschossen. Bei den ersten Genkanonen wurden zur Beschleunigung Platzpatronen verwendet. Zwischen Kugel und Pflanzengewebe ist ein Sperrgitter aus Kunststoff angebracht. Trifft die Kugel auf das Sperrgitter, so werden die mit DNA ummantelten Partikel durch das Gitter und die Vakuumkammer in das Pflanzengewebe geschleudert. Alternativ kann man die Partikel auch durch Hochspannung beschleunigen. Dadurch werden Wassertröpfchen verdampft, und durch die entstehende Druckwelle wird ein dünnes Metallplättchen mit den Partikeln gegen ein Stahlsieb geschleudert. Dieses hält das Metallplättchen zurück, die mit DNA ummantelten Partikel werden jedoch weiter in das Pflanzengewebe geschleudert (Abb. 14.7). Diese Methode hat den Vorteil, dass man die Stärke der angelegten Spannung steuern und so den Grad der Penetration in das Gewebe nach Wunsch verändern kann.

Wenn die Partikel in das Gewebe eindringen, gelangen sie ins Cytoplasma oder in den Zellkern der Blatt- oder Kalluszellen. In den Zellen löst sich die DNA von den Partikeln, und es kann eine ungehinderte Rekombination mit der chromosomalen DNA der Pflanze erfolgen (Abb. 14.8). Anschließend überführt man das Blatt- oder Kallusgewebe in Selektionsmedien. Darin können die Zellen, welche die DNA mit dem selektierbaren Marker eingebaut haben, wachsen, andere Zellen sterben hingegen ab. Die transformierten Pflanzen werden dann durch Gewebekultur regeneriert und schließlich auf das interessierende Gen hin analysiert.

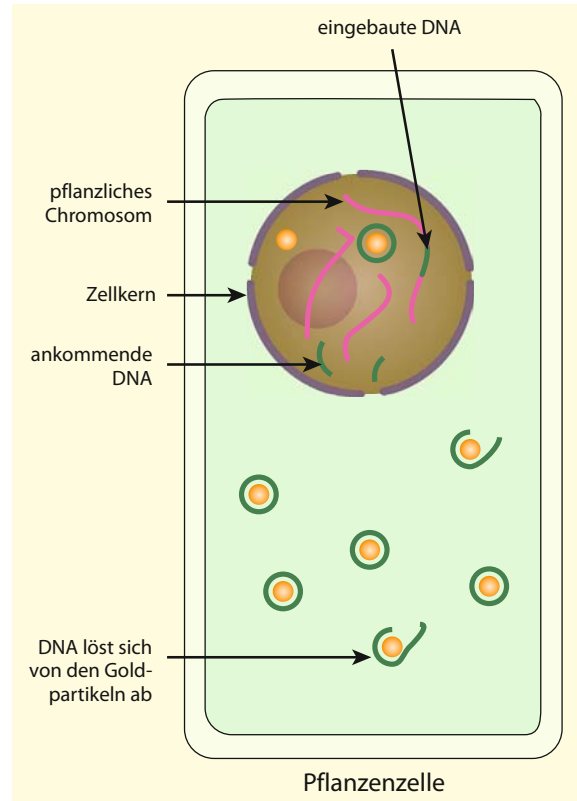
Partikelkanonen wurden auch bei den Geweben von Tieren mit Erfolg eingesetzt (s. Kap. 15). Außerdem haben Wissenschaftler die Technik so modifiziert, dass sie damit auch DNA in die Mitochondrien von Hefe oder die Chloroplasten von *Chlamydomonas*, einer kleinen Grünalge, transformieren können.

Mit transgener DNA ummantelte Goldpartikel können mittels einer Genkanone in Pflanzenzellen geschossen werden. Dort löst sich die transgene DNA von den Partikeln ab und wird in das Genom der Pflanze eingebaut.



14.7 Zwei Formen von Genkanonen (Partikelkanonen für DNA)

Teil **a** zeigt eine Genkanone, die mit Luftdruck arbeitet, die Genkanone in Teil **b** funktioniert mit Hochspannung. In beiden Fällen wird das Projektil durch die Sperrplatte aufgehalten, während die mit DNA ummantelten Metallpartikel bis ins Pflanzengewebe eindringen.



14.8 An mikroskopisch kleinen Goldpartikeln haftende DNA kann sich in die Chromosomen der Pflanzen einbauen

Nach Eindringen in die Zelle löst sich die DNA von den Goldpartikeln ab. Ein Teil der DNA gelangt in den Zellkern und wird erfolgreich in die Chromosomen der Pflanze eingebaut.

Nachweis des Einbaus von DNA

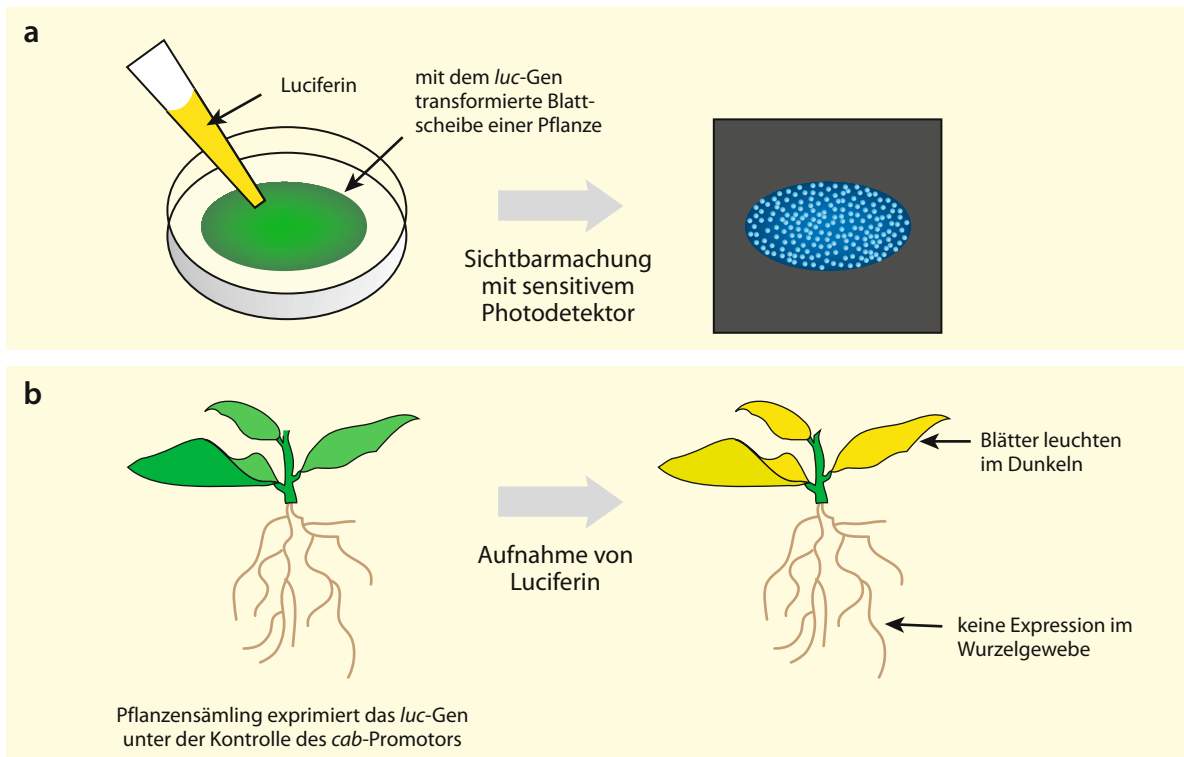
Wie kann man feststellen, ob die DNA tatsächlich in die Zielzellen gelangt ist? Als gute Indikatoren für das Vorhandensein des Transgens in der Pflanze eignen sich selektierbare Marker oder Reportergene, die auf demselben DNA-Abschnitt liegen wie das Transgen. Sehr häufig verwendet wird das Reportergen *npt*, das für **Neomycin-Phosphotransferase** codiert. Dieses Enzym inaktiviert das Antibiotikum Neomycin durch Übertragung einer Phosphatgruppe. Zellen, in die DNA mit dem *npt*-Gen erfolgreich eingebaut wurde, werden nicht mehr durch Neomycin abgetö-

tet. Dies ermöglicht eine direkte Selektion transformierter Zellen, denn bei Behandlung mit Neomycin werden sämtliche Zellen abgetötet, welche die DNA nicht eingebaut haben.

Es gibt auch nichtletale Diagnosemethoden, etwa den Einbau eines Reportergens, das für **Luciferase** codiert. Bei Anwesenheit seines Substrats **Luciferin** leuchtet dieses Enzym (Abb. 14.9a). In der Natur kommt Luciferase in verschiedenen lumineszierenden Organismen vor, von Glühwürmchen bis zu leuchtenden Kalmaren. Die für Luciferase codierenden Gene von Eukaryoten und Prokaryoten werden als *luc* beziehungsweise *lux* bezeichnet. Beide Formen von Luciferase erzeugen eine Lumineszenz, allerdings mit chemisch abweichenden Luciferinen und durch andere Reaktionsmechanismen. Wird DNA mit dem eukaryotischen *luc*-Gen erfolgreich in eine pflanzliche Zielzelle eingebaut, entsteht bei Zugabe von Luciferin Lumineszenz. In diesem Fall wird das Luciferin mit endogenem ATP und O₂ oxidiert. Wenn Luciferase in großem Umfang exprimiert wird,

ist das Leuchten mit bloßem Auge zu erkennen, in der Regel ist die Lichtmenge jedoch so gering, dass man sie mit empfindlichen elektronischen Messgeräten wie Szintillationszählern, einem Photodetektor oder einer CCD-Kamera messen muss.

Dieses Reportergen hat noch einen weiteren Vorteil. Das Luciferaseprotein bleibt in der Pflanze nicht lange stabil. Deshalb korreliert die Menge an aktivem Protein zu jedem Zeitpunkt mit dem Grad der Genexpression. Somit kann man mit diesem Reportergen die Aktivität bestimmter Promotoren überprüfen. Steuert beispielsweise der *cab*-Promotor die Expression des *luc*-Gens, so wird Luciferase nur dann produziert, wenn dieser Promotor in der Pflanze angeschaltet ist. Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit diesem Konstrukt emittieren nur Licht durch Luciferase in photosynthetischem Gewebe, das Licht ausgesetzt ist – das entspricht den natürlichen Bedingungen, um die Expression des pflanzlichen *cab*-Gens zu induzieren (Abb. 14.9b). Auch andere Promotoren können mit dem *luc*-Gen analysiert werden.



14.9 Luciferase als Reporter in Pflanzengewebe

Pflanzengewebe, in welches das *luc*-Gen für Luciferase von Glühwürmchen eingebaut wurde, emittiert bei Zugabe des Substrats Luciferin blaues Licht. In Teil **a** ist eine Blattscheibe in einem Photodetektor zu sehen. In **b** wird das *luc*-Gen in einem Sämling unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert.

Sind die Zellen, die das Reportergen erfolgreich exprimieren, identifiziert, kann man daraus mittels Gewebekultur vollständige Pflanzen regenerieren. Die entstehenden Pflanzen kann man dann auf das interessierende Gen oder Transgen hin analysieren. Durch Techniken wie PCR (s. Kap. 4) lässt sich die Anwesenheit des Transgens bestätigen. Die relative Position des eingebauten Transgens im Chromosom kann man mittels weiterer Analysen wie Southern Blots feststellen. Nachdem inzwischen die Genome mehrerer Pflanzen vollständig sequenziert sind, wurde die Lokalisation von Transgenen sehr viel leichter.

Der Einbau eines Transgens lässt sich mit verschiedenen Formen von Reportergenen nachweisen. Neomycin-Phosphotransferase inaktiviert das Antibiotikum Neomycin und macht somit sämtliche Zellen mit dem Transgen resistent gegen eine Neomycinbehandlung. Das Luciferasegen lässt Zellen in Anwesenheit des Transgens in ultraviolettem Licht leuchten.

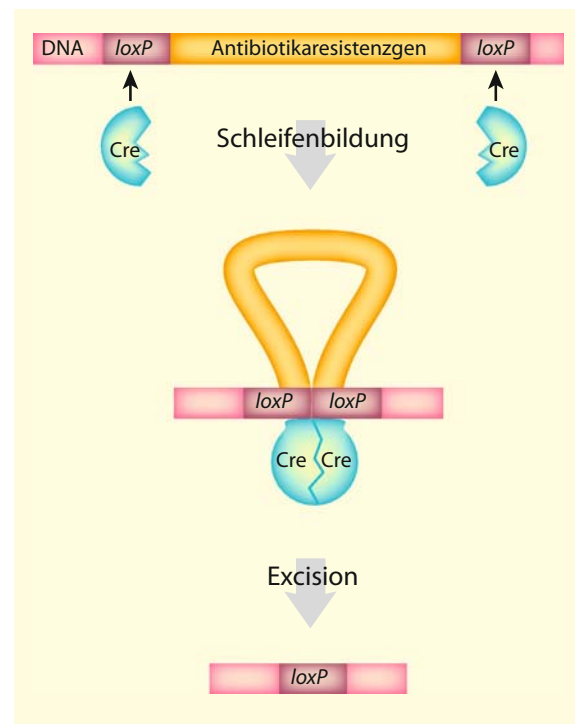
Anwendung des Cre/loxP-Systems

Der Einbau von selektierbaren Markern oder Reportergenen gehört zu den am häufigsten beanstandeten Aspekten bei der Anwendung transgener Techniken in der Landwirtschaft. Viele Verbraucher sind vor allem über die Existenz eines Gens für Antibiotikaresistenz in Lebensmitteln besorgt. Es gibt jedoch genetische Techniken, mit denen man das Reporter- oder Resistenzgen wieder entfernen kann, nachdem man den erfolgreichen Einbau der DNA überprüft hat.

Der Bakteriophage P1, der von Natur aus *E. coli* infiziert, hat zur Rekombination das einfache **Cre/loxP**-System (*cre* steht für engl. *causes recombination*). Das **Cre**-Protein ist ein Rekombinaseenzym, das eine spezifische, 34 Basen umfassende DNA-Sequenz erkennt, die **loxP**-Sequenz, und die Rekombination zwischen zwei **loxP**-Sequenzen katalysiert (Abb. 14.10). Indem man zu beiden Seiten eines DNA-Abschnitts jeweils gezielt eine **loxP**-Sequenz platziert, kann die darin eingeschlossene Region durch die Cre-Rekombination eliminiert werden. Dazu wird das *cre*-Gen ebenfalls in das transgene Konstrukt aufgenommen und dann exprimiert, wenn der unerwünschte DNA-Abschnitt herausgeschnitten

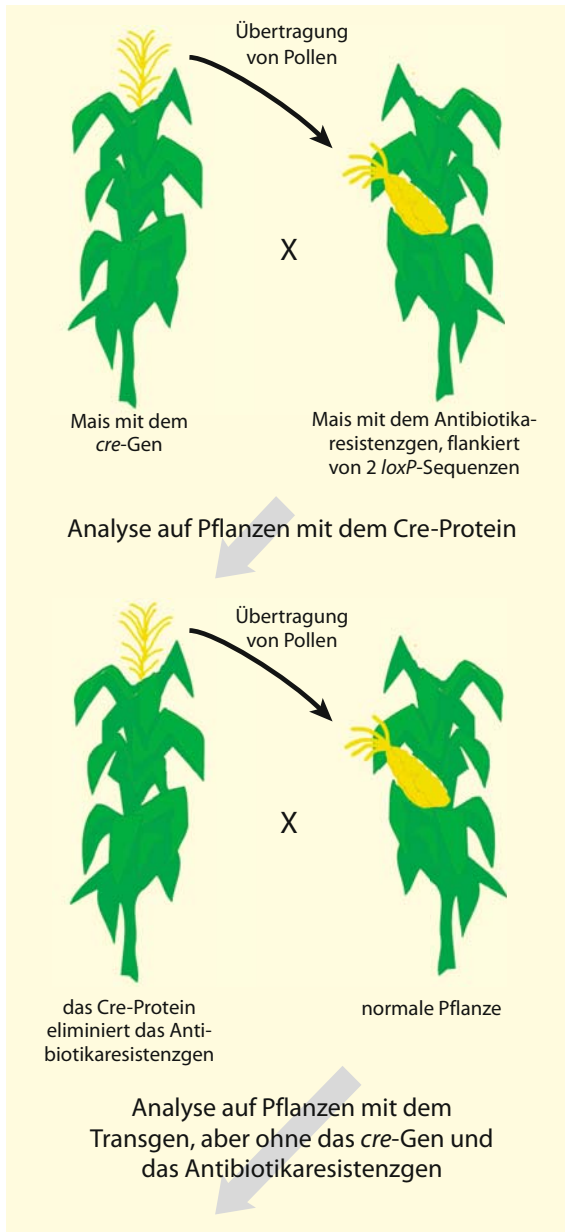
werden soll (s. unten). Mit dieser Methode lassen sich selektierbare Markergene nach Gebrauch wieder aus pflanzlicher DNA entfernen. Der aus dem Chromosom durch Rekombination eliminierte DNA-Abschnitt enthält weder einen Replikationsursprung noch Telomere und wird daher entweder abgebaut oder geht während Mitose und Meiose verloren.

Das *cre*-Gen lässt sich durch Fremdbestäubung zwischen zwei verschiedenen Pflanzen hinzufügen. Eine Pflanze trägt das Transgen plus den selektierbaren Marker, flankiert von zwei **loxP**-Sequenzen, die andere Pflanze ist in Besitz des *cre*-Gens (an einer anderen Stelle eingebaut; Abb. 14.11). Zunächst wird der Pollen von der Pflanze mit dem *cre*-Gen auf die Narbe der Pflanze mit dem Transgen übertragen. Die daraufhin gebildeten Samen lässt man keimen und überprüft sie auf ihre Sensitivität gegenüber der selektiven Substanz (z.B. Neomycin). Ist bei den Nachkommen das Cre-Protein vorhanden, so wird das Gen für den selektierbaren Marker herausgeschnitten und geht im



14.10 Das Cre/loxP-System des Bakteriophagen P1

Das Cre-Protein bindet an die **loxP**-Erkennungssequenzen in der DNA. Nun werden zwei nahe beieinander liegende **loxP**-Sequenzen zusammengebracht, und durch Rekombination dieser Sequenzen wird der dazwischen liegende DNA-Abschnitt eliminiert. Übrig bleibt im Ziel-DNA-Molekül eine einzelne **loxP**-Sequenz.



14.11 Fremdbestäubungsschema zur Eliminierung unerwünschter Markergene

Pollen einer Pflanze mit dem *cre*-Gen wird auf eine transgene Pflanze der ersten Generation übertragen, die noch ein Markergen für Antibiotikaresistenz enthält. Durch Expression des Cre-Proteins in den Nachkommen wird das Markergen herausgeschnitten. Schließlich werden Pflanzen, bei denen der Antibiotikaresistenzmarker eliminiert wurde, mit Wildtyppflanzen gekreuzt. Es kommt zu einer normalen mendelschen Aufteilung, sodass einige Nachkommen dieser Kreuzung das *cre*-Gen besitzen, andere nicht. Die Pflanzen, die das *cre*-Gen nicht besitzen, dienen zur weiteren Verwendung.

Laufe des Wachstums verloren. Diese Pflanze enthält nun das Transgen und das *cre*-Gen, aber nicht mehr das Gen für die Antibiotikaresistenz. Führt man nun eine weitere Kreuzung zwischen dieser transgenen Pflanze und einer Wildtyppflanze durch, werden einige der Nachkommen das Transgen aufweisen, aber nicht das *cre*-Gen. Mit dieser genetischen Methode kann man sicherstellen, dass die transgene Pflanze letztendlich ausschließlich ein zusätzliches Gen besitzt, nämlich das Transgen. Dieses System ist so einfach anzuwenden und so vorteilhaft, dass inzwischen sämtliche neuen transgenen Pflanzensorten, die für die Allgemeinheit freigegeben werden, nur noch das einzelne interessierende Transgen enthalten.

Mithilfe des Cre/*loxP*-Systems lassen sich Reportergene aus dem Genom eliminieren. Bei Cre handelt es sich um eine Rekombinase. Diese bindet an *loxP*-Sequenzen zu beiden Seiten des Reportergens und schneidet sämtliche dazwischen liegende DNA heraus.

Züchtung und Überprüfung von Pflanzen

Eine transgene Pflanze zu erzeugen, ist ein relativ einfacher Schritt. Den zeitaufwendigsten Teil dieses gesamten Prozesses bildet die anschließende Analyse und Überprüfung der transformierten Pflanzen. Der Expressionsgrad des Transgens kann abhängig von der Zahl der eingebauten Gene und ihrer Position beträchtlich schwanken. Jeden unabhängigen Einbau eines Transgens bezeichnet man als **Ereignis**. Wird beispielsweise eine Kopie des Transgens in Chromosom 2 des ersten Transformanden eingebaut, würde man von Ereignis 1 sprechen. Würde im selben Experiment eine andere transformierte Pflanze dasselbe Transgen in Chromosom 4 einbauen, wäre dies ein zweites Ereignis. Die Position des Einbaus wirkt sich auf die Expression des Transgens aus. Wird das Transgen bei Ereignis 1 in einen Abschnitt Heterochromatin (s. Kap. 2) eingebaut, so wird das Gen wahrscheinlich abgeschaltet und überhaupt nicht exprimiert, selbst dann nicht, wenn es mit einem starken Promotor versehen ist. Erfolgt im Gegensatz dazu bei Ereignis 2 der Einbau des Transgens direkt strangabwärts eines sehr aktiven chromosomalen Gens, wird das Transgen vermutlich in hohem Umfang exprimiert. Auch die Zahl

der eingebauten Gene kann schwanken. Häufig erhält eine einzelne transformierte Pflanze mehrere Kopien desselben Transgens.

Als Erstes muss geklärt werden, ob das Transgen schädlich für die Pflanze ist. Funktioniert das Transgen wie erwartet? Beeinflusst das Transgen die Qualität der Nutzpflanze? Wirkt sich das Transgen auf das Ökosystem aus? Die Antworten auf diese Fragen hängen davon ab, welches Transgen verwendet wurde (s. weiter unten für spezifische Beispiele).

Lassen sich keine nachteiligen Wirkungen feststellen, muss das Transgen von der Versuchspflanze auf eine andere mit höherem Ertrag übertragen werden. Die meisten transgenen Pflanzen werden aus alten Sorten erzeugt, die sich gut für die Arbeit im Labor eignen, aber keinen besonders hohen Samenertrag pro Flächeneinheit liefern oder sehr krankheitsanfällig sind. Zudem kann, wie bereits erwähnt, die Regeneration von Pflanzen durch Gewebekultur selbst Mutationen auslösen. Um diese Probleme zu umgehen, überträgt man das Transgen durch herkömmliche Fremdbestäubung auf ertragreiche Sorten, die bereits angebaut werden. Dazu wird zunächst der Pollen von der Pflanze mit dem Transgen gesammelt und auf die Narbe der ertragreichen Sorte übertragen. Die aus dieser Kreuzung hervorgehenden Samen werden geerntet und gezogen. Von dieser F_1 -Generation selektiert man alle Pflanzen, die das Transgen enthalten. Bewirkt das Transgen beispielsweise eine Resistenz gegen ein Herbizid, so spritzt man die Pflanzen der F_1 -Generation mit diesem; dadurch werden alle Pflanzen ohne das Transgen abgetötet. Mit den Pollen der überlebenden F_1 -Pflanzen führt man nun eine **Rückkreuzung** mit der ertragreichen Elternpflanze durch. Man lässt die Samen keimen, selektiert die Pflanzen mit dem Transgen und wiederholt das Ganze etwa vier- bis fünfmal. Ein solches Kreuzungsschema gewährleistet, dass ungefähr 98 % der Gene der letztlich entstehenden Pflanzen von der ertragreichen Sorte stammen, die übrigen Gene hingegen von der transgenen Ausgangspflanze. Ein solches Rückkreuzungsprogramm kann sich über mehrere Jahre erstrecken, weil jede Generation Mais, Sojabohnen oder Baumwolle einen gesamten Sommer für ihr Wachstum benötigt.

Nach der Rückkreuzung des Transgens in eine geeignete Sorte versucht man durch Feldtests festzustellen, wie das Transgen sich auf Wachstum, Ertrag, Krankheitsresistenz und andere wichtige Merkmale der Pflanze auswirkt. Diese Feldtests müssen an vielen verschiedenen Standorten durchgeführt werden, um Faktoren wie Bodentyp, Geländeform, Niederschläge und so weiter zu berücksichtigen. Auch diese

Feldtests können sich über mehrere Jahre hinziehen. Unterschiedliche Niederschlagsmengen in den verschiedenen Jahren können den Ertrag beispielsweise stark beeinflussen. Der Pflanzenzüchter selektiert ausschließlich Pflanzen, die beständig den höchsten Ertrag erbringen und die beste Krankheitsresistenz zeigen. Alle anderen Pflanzen werden nie wieder angebaut.

Ein weiteres Problem stellt die Zulassung transgener Pflanzen dar. Hierbei geht es unter anderem darum, wo solche Pflanzen angebaut werden dürfen und wie sich die Transgene auf die Pflanze, das Ökosystem und ähnliche oder verwandte Pflanzen auswirken könnten.

Nach dem Saatgutverkehrsgesetz muss in Deutschland jede Pflanzensorte zugelassen werden. Dies gilt auch für die Zulassung neuer Sorten, die sich aus transgenen Pflanzen ableiten. Zuständig für die Zulassung neuer Pflanzensorten ist das Bundessortenamt. Voraussetzung für eine Zulassung einer Sorte ist ihre Unterscheidbarkeit, Homogenität, Beständigkeit und bei landwirtschaftlich genutzten Pflanzenarten ihr landeskultureller Wert. Daher kann eine Sorte nur dann zugelassen werden, wenn sie beim Anbau, beim Ertrag oder der Qualität der Ernteprodukte Verbesserungen erwarten lässt. Ob dies zutrifft, muss mit einer Wertprüfung festgestellt werden. Hierbei wird die neue Sorte über mindestens zwei, in der Regel drei Jahre an mehreren Standorten angebaut.

Für Sorten, die aus transgenen Pflanzen resultieren, gelten die gleichen Prüfkriterien – unabhängig davon, auf welche Weise sie gezüchtet wurden. Vor der sortenrechtlichen Zulassung müssen gentechnisch veränderte Pflanzen jedoch nach den Bestimmungen der EU-Freisetzungs-Richtlinie – bzw. dem deutschen Gentechnik-Gesetz – zur Freisetzung oder zum Inverkehrbringen genehmigt werden. Die wichtigste Voraussetzung hierfür ist eine positive Umweltverträglichkeitsprüfung der Pflanze. Dies soll sicherstellen, dass die Pflanze der Umwelt nicht schadet.

Meist gehen aus einer gentechnisch veränderten Pflanze mehrere Sorten hervor. Das transgene Material – etwa eine Herbizid- oder Insektenresistenz – wird in verschiedene Sorten mit jeweils unterschiedlichen Eigenschaften eingekreuzt. Oft erwerben Züchtungsunternehmen die Nutzungsrechte für ein Genkonstrukt und bringen es in ihre eigenen Sorten ein.

In Deutschland wurden die ersten transgenen Maissorten Ende 2005 zugelassen. Zur Anbausaison 2008 waren sieben genetisch veränderte Sorten erhältlich, die alle aus dem Bt-Mais MON810 hervor-

gegangen sind. Weitere MON810-Sorten befinden sich im sortenrechtlichen Prüfverfahren.

Zuvor waren bereits die ersten transgenen Mais-sorten in den gemeinsamen Sortenkatalog der EU eingetragen worden. Bis Februar 2008 war ihre Zahl auf 70 Sorten gestiegen, die sich alle von dem Bt-Mais MON810 ableiten. Die einzelnen Zulassungen wurden in Spanien, Frankreich und für Deutschland erteilt.

Damit eine transgene Pflanze kommerziell angebaut werden kann, muss das Transgen zunächst in eine andere Sorte der Pflanze eingekreuzt werden. Vor der kommerziellen Nutzung werden transgene Pflanzen eingehend überprüft.

Transgene Pflanzen mit Herbizidresistenz

Landwirte geben weltweit jährlich umgerechnet über acht Milliarden Euro für Herbizide (Unkrautbekämpfungsmittel) aus. Dennoch belaufen sich die Ernte-einbußen aufgrund von Unkräutern auf 10 %. Problematisch ist unter anderem, dass die verwendeten Chemikalien keine Unterscheidung zwischen Nutzpflanzen und Unkräutern treffen: Sie töten einfach jede Pflanze ab, mit der sie in Kontakt kommen. Lösen lässt sich dieses Problem beispielsweise dadurch, dass man die Nutzpflanzen durch gentechnische Veränderung resistent gegen das Herbizid macht. Dann

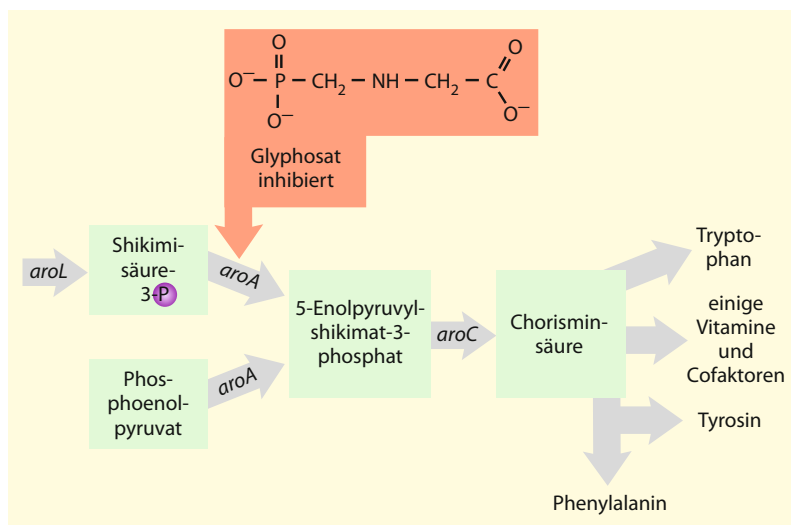
kann man es ohne Rücksicht auf Nutzpflanzen und Unkräuter anwenden: Die Unkräuter werden abgetötet, die Nutzpflanzen überleben.

Zu den besten Herbiziden auf dem Markt zählt **Glyphosat**, das die Firma Monsanto unter dem Handelsnamen Roundup vertreibt. Glyphosat ist relativ umweltfreundlich, weil es im Boden rasch in ungiftige Verbindungen abgebaut wird. Das Glyphosatmolekül ist ein dem Glycin verwandtes Aminosäurephosphatderivat. Es führt zum Absterben der Pflanzen, da es den Syntheseweg für die essenziellen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan blockiert. Wie in Abbildung 14.12 dargestellt, inhibiert Glyphosat ein bestimmtes Enzym dieses Syntheseweges, nämlich **EPSPS** (5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase), das Produkt des in Chloroplasten lokalisierten *aroA*-Gens. Dieses Enzym kommt natürlich in allen Pflanzen, Pilzen und Bakterien vor, jedoch nicht bei Tieren. Damit existiert das Zielenzym von Glyphosat auch nicht beim Menschen. Alle Tiere, einschließlich des Menschen, müssen aromatische Aminosäuren mit der Nahrung aufnehmen, weil sie diese nicht selbst synthetisieren können. Werden Pflanzen mit Glyphosat gespritzt, gelangt es in die Chloroplasten, bindet an das EPSPS-Protein und blockiert den Syntheseweg für aromatische Aminosäuren. Damit verhungert die Pflanze buchstäblich.

Da es sich schwierig gestaltet, direkt in den Pflanzen eine Resistenz zu entwickeln, schlugen die Wissenschaftler einen anderen Weg ein. EPSPS findet sich auch in Bakterien, also suchten die Wissenschaftler hier nach einem EPSPS-Enzym, das resistent gegen Glyphosat ist, aber dennoch aromatische

14.12 Glyphosat hemmt EPSPS im Syntheseweg für aromatische Aminosäuren

Das Enzym 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) ist das Produkt des *aroA*-Gens und sorgt für die Bildung von 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat, einer Vorstufe des Syntheseweges aromatischer Aminosäuren und Cofaktoren. Durch Glyphosat, ein Analogon von Phosphoenolpyruvat, wird EPSPS inhibiert.



Aminosäuren synthetisieren kann. Mutierte Stämme von *Agrobacterium* mit Resistenz gegen Glyphosat kann man durch Ausplattieren auf Glyphosat-haltigem Medium direkt selektieren. Die EPSPS dieser Mutanten ist glyphosatresistent, trotzdem aber enzymatisch aktiv. Diese Glyphosat-resistente Version des *aroA*-Gens hat man kloniert (s. Kap. 3) und zur Expression in Pflanzen modifiziert. Dazu wurden die bakteriellen Promotor- und Terminatorsequenzen durch pflanzliche Promotoren und Terminatoren ersetzt. Um eine Selektion zu ermöglichen, wurde dem Konstrukt außerdem noch ein Antibiotikaresistenzgen hinzugefügt. Da EPSPS im Chloroplasten lokalisiert ist, fügte man schließlich noch vor das Gen eine DNA ein, die für ein kleines **Chloroplasten-Transit-Peptid** codiert. Das Chloroplasten-Transit-Peptid findet sich nach der ersten Synthese des Proteins an dessen N-Terminus und sorgt für seinen Transport zum Chloroplasten. Beim Durchtritt durch die Chloroplastenmembran wird das Transit-Peptid abgespalten, sodass nur das funktionelle Enzym in den Chloroplasten gelangt (Abb. 14.13).

Das Glyphosat-resistente *aroA*-Gen aus *Agrobacterium* wurde in verschiedene Nutzpflanzen transformiert, beispielsweise in Sojabohnen, Baumwolle und Raps. Bei Raps und Baumwolle erfolgte der Gentransfer mithilfe der Ti-Plasmid-Methode, die Sojabohnen wurden mit der Genkanone modifiziert. Die daraus resultierenden Herbizid-resistenten Pflanzen waren nach Regeneration aus Gewebekultur leicht zu identifizieren.

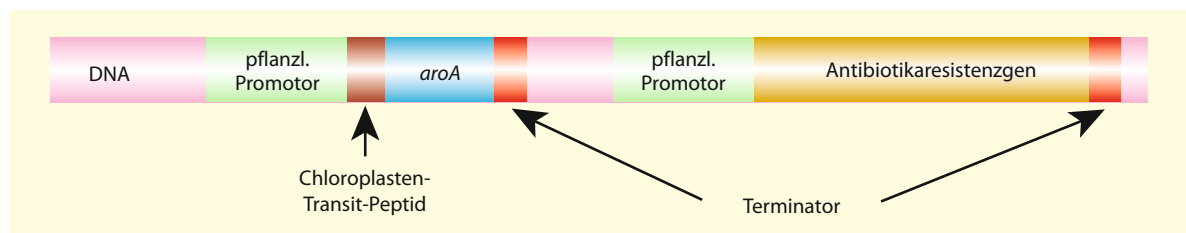
Bei einem Vergleich des mutierten bakteriellen *aroA*-Gens mit der sensitiven Wildtypversion zeigte sich, welche Aminosäureänderungen für die Glyphosatresistenz erforderlich waren. Da die bakteriellen und pflanzlichen *aroA*-Gene homolog sind, sollten äquivalente Austausche bei den pflanzlichen *aroA*-Genen ebenfalls zu einer Glyphosatresistenz führen.

Diese Informationen machten es möglich, das *aroA*-Gen von Mais durch Veränderung seiner DNA-Sequenz *in vitro* zu modifizieren. Nach Wiedereinbau in Maispflanzen mittels einer Genkanone verlieh das modifizierte *aroA*-Gen dem Mais eine Resistenz gegen Glyphosat.

Es wurden auch noch weitere Gene für Herbizidtoleranz zur Herstellung transgener Nutzpflanzen verwendet, diese sind jedoch nicht so weit verbreitet wie transgene Pflanzen mit Roundup-Resistenz. Ein Beispiel ist die Resistenz gegen Sulfonylharnstoffe und Imidazolinone, die ein Enzym im Syntheseweg der verzweigten Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin inhibieren. Pflanzen, die gegen diese Herbizide resistent sind, kommen recht häufig vor, denn nur ein einziger Aminosäureaustausch reicht aus, um das Enzym resistent zu machen; die Aminosäuren können aber nach wie vor synthetisiert werden. Ein weiteres Beispiel ist die Resistenz gegen Glufosinat, ein Herbizid, das die Synthese von Glutamin hemmt. Ursprünglich entdeckt wurde Glufosinat als Antibiotikum, das von *Streptomyces* produziert wird. Somit identifizierten die Wissenschaftler das Enzym, das verhindert, dass *Streptomyces* von seinem eigenen Antibiotikum geschädigt wird. Dieses Gen wurde kloniert und in Nutzpflanzen transformiert.

Glyphosat hemmt EPSPS im Biosyntheseweg der Pflanzen für aromatische Aminosäuren. Da der Mensch kein EPSPS-ähnliches Enzym besitzt, ist es als Herbizid gut geeignet.

Um gegen Glyphosat resistente transgene Pflanzen zu erzeugen, muss das EPSPS-Gen so modifiziert werden, dass es die Bindung von Glyphosat verhindert. Das mutierte EPSPS wurde in Bakterien synthetisiert und zur Expression in Pflanzen modifiziert.



14.13 Expression des *aroA*-Gens von *Agrobacterium* in Pflanzen

Das bakterielle *aroA*-Gen muss der Kontrolle eines in Pflanzen aktiven Promotors unterstellt werden. Damit das AroA-Protein (EPSPS) korrekt im Chloroplasten lokalisiert wird, muss am N-Terminus des Proteins ein Chloroplasten-Transit-Peptid angehängt sein.

Transgene Pflanzen mit Insektenresistenz

Unkräuter sind schon eine Plage, noch schlimmere Feinde der Pflanzen und entsprechend noch kostspieliger für die Landwirte sind jedoch:

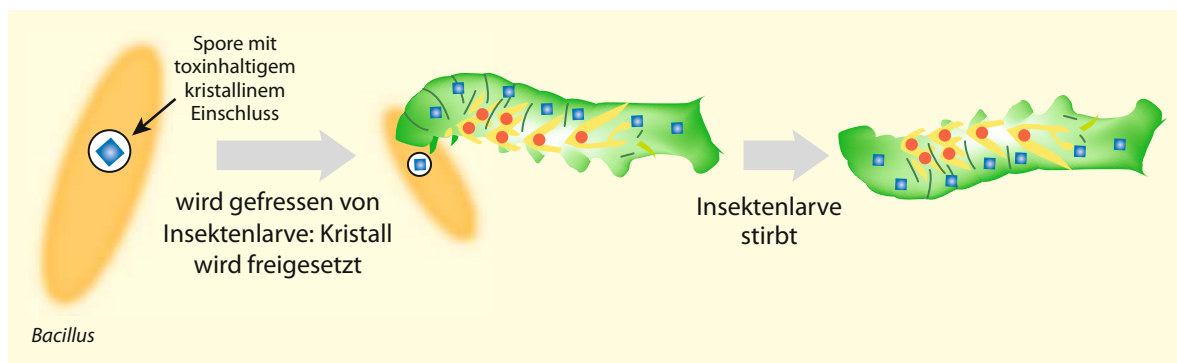
1. Insekten und Fadenwürmer (Nematoden);
2. Pilzkrankheiten (Schimmel, Mehltau, Rost und Fäule);
3. Viruserkrankungen von Pflanzen.

Gegen all diese Schädlinge kann man durch gentechnische Modifikation resistente Pflanzen erzeugen, hier sollen jedoch lediglich die Insekten betrachtet werden. Das Spritzen von Nutzpflanzen mit Insektiziden ist sehr kostspielig und riskant. Insektizide sind für den Menschen meist toxischer als Herbizide, weil ihre Zielarten uns näher stehen. Viele der biochemischen Reaktionswege von Insekten finden sich nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Nagetieren oder Vögeln, die Felder bewohnen. Glücklicherweise gibt es aber auch natürlich vorkommende Toxine, die für Insekten letal, für Säugetiere jedoch völlig harmlos sind. Ein ausgezeichnetes Beispiel hierfür ist das Toxin des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis*. Dieses sogenannte **Bt-Toxin** wurde bei Nutzpflanzen eingesetzt, um Ernteverluste bei Baumwolle und Mais durch den Baumwollkapselwurm beziehungsweise den Maiszünsler zu verhindern. Die Schäden durch den Maiszünsler plus die Ausgaben für die Insektizide zu seiner Bekämpfung verursachen den Landwirten jährlich Kosten in Höhe von rund 700 Millionen Euro. Die Maiszünslerschäden machen die Maispflanzen zudem besonders anfällig für Infek-

tionen mit einem toxischen Pilz, der bei Aufnahme auch für den Menschen schädlich sein kann.

Bakterien der Gattung *Bacillus* produzieren Sporen, die ein kristallines Protein enthalten, das sogenannte **Cry-Protein**. Nimmt ein Insekt die *Bacillus*-Sporen auf, wird das Cry-Protein zersetzt. Dabei wird **Delta-Endotoxin** (also das Bt-Toxin) freigesetzt. Dieses Toxin bindet an die Darmschleimhaut der Insekten und bewirkt die Bildung von Poren, die den Verdauungstrakt so stark schädigen, dass das Insekt stirbt (Abb. 14.14). Verschiedene *Bacillus*-Arten produzieren eine Familie unterschiedlicher, aber verwandter Cry-Proteine. Diese hat man ursprünglich anhand der Anfälligkeit der Insektengruppen eingeteilt: CryI tötet Vertreter der Lepidoptera (Schmetterlinge), CryII tötet Lepidoptera und Diptera (Zweiflügler), CryIII tötet Coleoptera (Käfer) und CryIV tötet Diptera (aber nicht Lepidoptera). Als immer mehr Cry-Varianten bekannt wurden, erwies sich diese Klassifizierung als zu stark vereinfacht, weil die Sequenzähnlichkeiten nicht immer dem Spektrum der Insektizidwirkung entsprachen. Heute teilt man die Cry-Proteine anhand von Sequenzähnlichkeiten in 20 mit arabischen Ziffern bezeichnete Unterfamilien ein.

Statt die Insekten durch Spritzen der Pflanzen mit dem Gift zu töten, haben Wissenschaftler mithilfe transgener Techniken die *cry*-Gene direkt in die Pflanzen eingebaut. Der Einbau eines klonierten Toxingens in Tomatenpflanzen verlieh diesen einen partiellen Schutz gegen den Tabakswärmer. Die Pflanzen synthetisierten allerdings nur geringe Mengen des Toxins, weil das Toxingen von einem Bakterium stammt und auf eine optimale Expression in Bakterien, nicht in Pflanzen, ausgerichtet ist.



14.14 Auf Insektenlarven wirkt Bt-Toxin tödlich

Auf dem Futter der Raupe finden sich Bakteriensporen von *Bacillus*. Bei der Verdauung der Sporen wird das kristalline Protein (Cry-Protein) freigesetzt; bei dessen Abbau entsteht ein für die Insektenlarve tödliches Toxin.

Deshalb versuchte man, die Expression des Toxins durch eine entsprechende Modifikation zu verbessern. Das Originaltoxin ist ein großes Protein aus 1156 Aminosäuren. Für die toxische Wirkung sind jedoch nur die ersten 650 Aminosäuren erforderlich. Darum hat man das Protein durch Entfernen der hinteren Hälfte des Gens verkürzt. Die Synthese des verkürzten Proteins benötigt weniger Energie. Anschließend unterstellte man das Toxin der Kontrolle eines Promotors, der in Pflanzen konstant eine Expression in hohen Mengen bewirkt. Bestimmte Promotoren aus Pflanzenviren wie dem Blumenkohlmosaikvirus erfüllen diese Anforderungen und führen zu einer zehnfachen Zunahme der Toxinproduktion.

Wenn Gene eines Organismus in ganz unterschiedlichen Wirtszellen exprimiert werden, wird auch der Codongebrauch zu einem Problem. Wie in Kapitel 2 erläutert, ist der genetische Code insofern redundant, als mehrere verschiedene Codons für dieselbe Aminosäure codieren können. Auch wenn die Aminosäuresequenz eines Proteins festgelegt ist, besteht dafür also eine beträchtliche Auswahl an möglichen Codons. Verschiedene Organismen favorisieren für die gleiche Aminosäure unterschiedliche Codons und verfügen über unterschiedliche Mengen der entsprechenden t-RNAs. Wenn ein Gen Codons für eine seltene rRNA verwendet, kann deren Vorrat die Rate der Proteinsynthese begrenzen. In der Praxis ist dies nur für Gene relevant, die in hohem Umfang exprimiert werden – genau diese Situation liegt hier vor. Deshalb hat man das Gen für das Insektentoxin modifiziert, indem man viele der Basen an der dritten Position redundanter Codons ausgetauscht hat. Um den Codongebrauch pflanzenähnlicher zu machen, musste man fast 20 % der Basen ändern. Nicht verändert wurden dadurch die codierten Aminosäuren, sodass das Toxinprotein selbst davon nicht betroffen war. Die Syntheserate, mit der Pflanzenzellen dieses Protein herstellten, stieg jedoch enorm an und führte zu einer weiteren zehnfachen Steigerung der Toxinproduktion.

Transgene Bt-Pflanzen wie Baumwolle und Mais haben viele Vorteile gegenüber dem direkten Spritzen der Felder mit dem Toxin. Dazu zählt, dass das Toxin nicht auf andere Gebiete übergreift und so eine Kreuzkontamination vermieden wird. Durch den Einsatz transgener Nutzpflanzen werden weniger Insektizide benötigt. Im Jahr 1998 wurden allein auf den Baumwollfeldern in den USA rund 450 000 kg weniger Insektizide ausgebracht. Dabei waren nur 45 % der Baumwollpflanzen tatsächlich transgene Pflanzen.

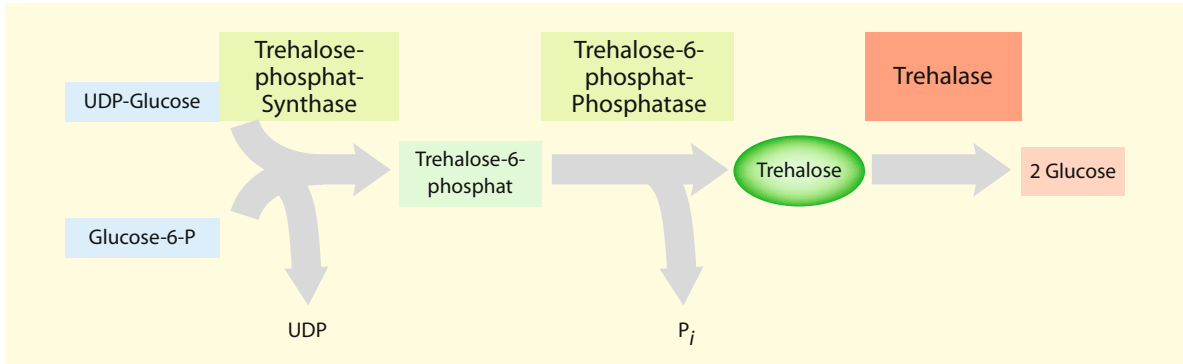
Man hat transgene Pflanzen erzeugt, die das Cry-Protein des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* exprimieren. Dieses Toxin wirkt tödlich auf Schadinsekten wie den Maiszünsler und den Baumwollkapselwurm.

Um eine gute Expression des bakteriellen cry-Gens zu erreichen, veränderte man die Wobble-Position und machte den Codongebrauch pflanzenähnlicher. Unnötige Bereiche des Gens wurden eliminiert, damit für die Produktion des Transgens weniger Energie benötigt wird.

Trehalose in transgenen Pflanzen erhöht die Stresstoleranz

Pflanzen sind ausgesprochen anpassungsfähig und haben zahlreiche Mechanismen entwickelt, um Umweltbelastungen zu überleben. Zwei solcher Stressfaktoren, die beim Anbau von Nutzpflanzen Probleme bereiten, sind Trockenheit und der hohe Salzgehalt von Bewässerungswasser. Trockentolerante Pflanzen, Pilze und Bakterien werden in Zeiten hoher Belastung von dem Zucker Trehalose geschützt. **Trehalose** ist ein nichtreduzierendes Speicherkohlenhydrat mit der Fähigkeit, Wassermoleküle zu absorbieren und wieder freizusetzen. Für die Synthese von Trehalose werden zwei Enzyme benötigt: **Trehalosephosphat-Synthase** wandelt UDP-Glucose und Glucose-6-phosphat in Trehalose-6-phosphat um. Danach spaltet **Trehalose-6-phosphat-Phosphatase** die Phosphatgruppe ab, und es entsteht Trehalose (Abb. 14.15). Ein weiteres Enzym, **Trehalase**, baut die Trehalose zu zwei Glucosemolekülen ab.

Um eine Reissorte zu schaffen, die toleranter gegen einen hohen Salzgehalt oder Trockenheit ist, hat man ein Fusionsgen erzeugt, das für ein Protein mit Trehalosephosphat-Synthase- wie auch Trehalose-6-phosphat-Phosphatase-Aktivität codiert. Dieses wurde dann mithilfe des Ti-Plasmids von *Agrobacterium* in die Reispflanzen transformiert. Man testete zwei verschiedene Konstrukte mit dem gleichen Fusionsgen, aber unterschiedlichen Promotoren. Das eine Konstrukt enthielt einen durch Stress induzierbaren Promotor, das andere einen durch Licht induzierbaren. Durch den Einbau dieser Gene wurden die Reispflanzen toleranter gegenüber hohen Salzkonzentrationen und Wassermangel. Mit einem konstitutiven



14.15 Synthese- und Abbauweg von Trehalose

Trehalose entsteht durch zwei enzymatische Reaktionen. Zunächst wandelt Trehalosephosphat-Synthase UDP-Glucose und Glucose-6-phosphat in Trehalose-6-phosphat um. Anschließend spaltet Trehalose-6-phosphat-Phosphatase die Phosphatgruppe ab, wodurch Trehalose entsteht. Durch Trehalase kann Trehalose in zwei Glucosemoleküle gespalten werden.

Promotor führte das gleiche Fusionsgen jedoch zu verkümmertem Wachstum. Die Expressionsmuster von Transgenen können sich also nachdrücklich auf das Ergebnis auswirken. Bislang hat man diese transgenen Reispflanzen noch nicht im Feld angebaut, dies zeigt aber, dass sich auch in einer sich wandelnden Umwelt immer wieder Wege finden lassen, Erträge und Qualität von Nahrungsmitteln zu steigern.

Die für die Biosynthese von Trehalose erforderlichen Enzyme wurden in Reispflanzen transformiert. Die resultierenden transgenen Pflanzen waren toleranter gegenüber hohen Salzkonzentrationen und Trockenheit.

Funktionelle Genomik bei Pflanzen

Da mittlerweile die vollständigen DNA-Sequenzen von Reis, Pappel und *Arabidopsis* bekannt sind, haben sich die Pflanzenforscher der funktionellen Genomik zugewandt. Sie arbeiten nicht mehr mit einzelnen Genen, sondern analysieren das gesamte Genom. Diese Forschungen erfolgen nach wie vor größtenteils an *Arabidopsis*, inzwischen jedoch auch vermehrt an Nutzpflanzenarten wie Reis, Mais und Sojabohnen. Auf dem Gebiet der funktionellen Genomik bei Pflanzen werden verschiedene Techniken eingesetzt, von denen einige bereits besprochen

wurden; die meisten beruhen jedoch auf einem Abschalten oder Blockieren der Genexpression. Man analysiert neue Gene und Stoffwechselwege, die für ein Verständnis der grundlegenden Physiologie von Pflanzen nützlich sind, weil man sich dadurch erhofft, die gegenwärtig verfügbaren Nutzpflanzen verbessern zu können.

Insertionen stellen eine Möglichkeit dar, die Funktion neuer Gene zu ermitteln. Mutanten von Pflanzen werden zum Beispiel durch den Einbau von Transposons oder T-DNA erzeugt. Hierbei enthält die T-DNA oder das Transposon anstelle eines Transgens lediglich ein Reportergen. Beim Einbau der T-DNA oder des Transposons in das pflanzliche Chromosom kann es zur Disruption eines Pflanzengens kommen. Wird durch die Insertion die Funktion eines Pflanzengens ausgeschaltet, kann man den daraus resultierenden Phänotyp überprüfen und analysieren. Durch Klonierung der strangaufwärts und strangabwärts von der Insertion liegenden Abschnitte kann man dann feststellen, welches pflanzliche Gen diesem Phänotyp entspricht.

Mittels Gen-Silencing kann man die Funktion pflanzlicher Gene ebenfalls ermitteln. Wie in Kapitel 5 erläutert, wurde das Phänomen des Gen-Silencing durch RNA-Interferenz (RNAi) ursprünglich bei Pflanzen beschrieben. Ausgelöst wird die RNAi durch eine doppelsträngige RNA, die in kurze Abschnitte zerschnitten wird (siRNA für engl. *short interfering RNA*). Der RISC-Enzymkomplex erkennt mithilfe von siRNA homologe RNA (insbesondere mRNA) und schneidet diese in Stücke. Dadurch wird verhindert, dass die mRNA in Proteine exprimiert

Exkurs 14.1

Phytoremediation und andere Einsatzmöglichkeiten für transgene Pflanzen

Für transgene Pflanzen gibt es viele verschiedene Einsatzmöglichkeiten, mit denen sich die landwirtschaftlichen Erträge steigern lassen. Dazu zählen beispielsweise Herbizidtoleranz, Schädlingsresistenz, Trockentoleranz, geringerer Düngemittelverbrauch, höhere Erträge sowie ein höherer Nährwert für Mensch und Tier. Diese Anwendungen sind für unser Überleben bei weitem am bedeutendsten und umfassen die meisten der biotechnologischen Einsatzgebiete transgener Pflanzen. Aufgrund ihrer vielfältigen und einzigartigen Eigenschaften gibt es für transgene Pflanzen aber auch noch andere Anwendungsmöglichkeiten außerhalb der Landwirtschaft. Eine davon ist die Phytoremediation oder Phytosanierung. Darunter versteht man die Reinigung von kontaminierten Böden und schadstoffbelastetem Wasser mithilfe von Pflanzen. Diese Anwendungsmöglichkeit transgener Pflanzen steckt noch in den Kinderschuhen, doch sind in den letzten Jahren einige Fortschritte gelungen.

Es gibt zwei Möglichkeiten für die Phytoremediation schadstoffbelasteter Böden. Die erste ist die Phytostabilisierung. Sie sorgt für eine Vegetationsdecke auf schadstoffbelasteten Standorten. Die Pflanzen sollen den Boden vor Erosion durch Wind und Wasser schützen. Zwar wird eine Phytostabilisierung meistens mit normalen Pflanzen durchgeführt, durch den Einsatz transgener Pflanzen könnte man jedoch für ein kräftigeres Wurzelwerk oder eine höhere Toleranz gegenüber den Schadstoffen sorgen. Die zweite Möglichkeit wird als Phytoextraktion bezeichnet. Hierbei nehmen die Pflanzen die Schadstoffe direkt in ihre Gewebe auf. Anschließend

können die Pflanzen abgeerntet und entsprechend entsorgt werden.

Manche Pflanzen verfügen von Natur aus über Systeme, um Schwermetallionen aufzunehmen, während andere zur Aufnahme von Toxinen zunächst modifiziert werden müssen. Ein natürlicher Akkumulator ist der Gebärdete Saumfarn (*Pteris vittata*); er kann bis zu $7500 \mu\text{g/g}$ Arsen aus kontaminierten Böden anreichern. Manche Pflanzen können in ihren Blättern 200-mal mehr Arsen ansammeln, als im Boden vorhanden ist.

Alternativ kann man auch transgene Pflanzen erzeugen, um toxische Schadstoffe zu beseitigen. Zu diesem Zweck hat man in das Genom von *Arabidopsis*, Tabak und Pappeln das *merA*- und *merB*-Gen von Bakterien eingebaut. Die von diesen Genen codierten Proteine entfernen Quecksilber ($\text{Hg}[\text{II}]$) aus organischen Quecksilberverbindungen und wandeln es in elementares Quecksilber um, das sich an der Luft verflüchtigt. Die bislang verfügbaren transgenen Pflanzen können Quecksilber noch nicht besonders effizient aus Böden eliminieren, denn die Lokalisierung der MerA- und MerB-Proteine könnte es schwierig machen, das Quecksilber anzureichern. Durch Expression von MerA und MerB in den Zellwänden lässt sich die Quecksilberaufnahme-fähigkeit der transgenen Pflanzen erhöhen.

Die Erforschung der Genomik natürlicher Schwermetallakkumulatoren wird sich als sehr hilfreich erweisen, um die natürlichen Proteine und Reaktionswege zur Reinigung von toxischen Proteinen nachzuzeichnen. Solche Erkenntnisse werden den Einsatz transgener Pflanzen für die Phytoremediation rationalisieren.

wird. Dies macht man sich im Labor zunutze, indem man eine Pflanze mit einem kleinen Oligonucleotid transformiert, das RISC dazu anregt, die Expression eines bestimmten Gens aufzuheben. Die Pflanze kann dann daraufhin analysiert werden, ob ein sichtbarer Phänotyp mit dem Abschalten des Gens assoziiert ist.

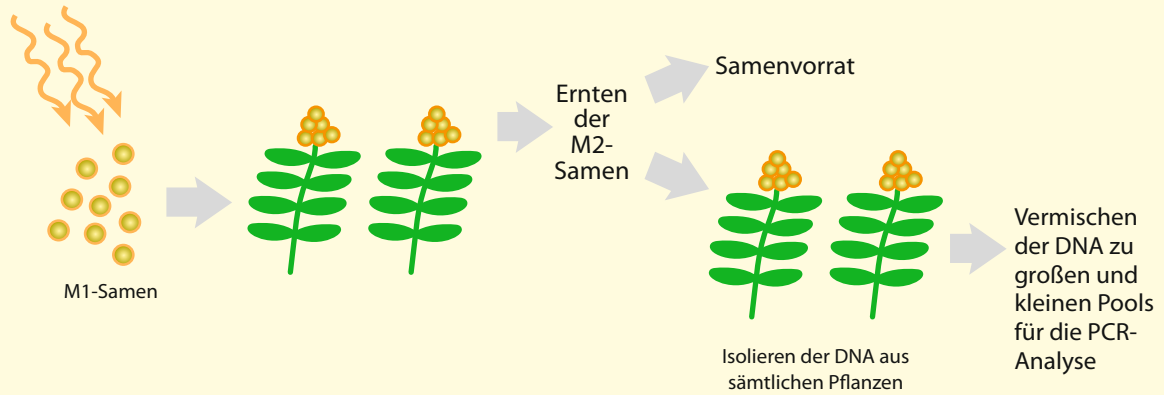
Gene lassen sich noch durch eine andere Methode abschalten, durch die **Mutagenese mit schnellen Neutronen** (engl. *fast neutron mutagenesis*). Hierbei werden mittels **schneller Neutronen** Deletionen der DNA induziert. Schnelle Neutronen entstehen durch nukleare Prozesse wie Kernspaltung, wobei freie Neutronen mit einer kinetischen Energie von nahe 1 MeV erzeugt werden. Diese Neutronen verursachen in exponierter DNA Deletionen. Wenn man Samen der interessierenden Pflanze schnellen

Neutronen aussetzt, entstehen dadurch zufällige Mutationen. Die Dosis der schnellen Neutronen und somit die Zahl der Deletionen pro Genom kann man steuern. Anschließend zieht man aus den mit schnellen Neutronen behandelten, sogenannten M1-Samen Pflanzen. Jede der Pflanzen weist eine oder mehrere unterschiedliche Deletionen und potenziell einen anderen Phänotyp auf.

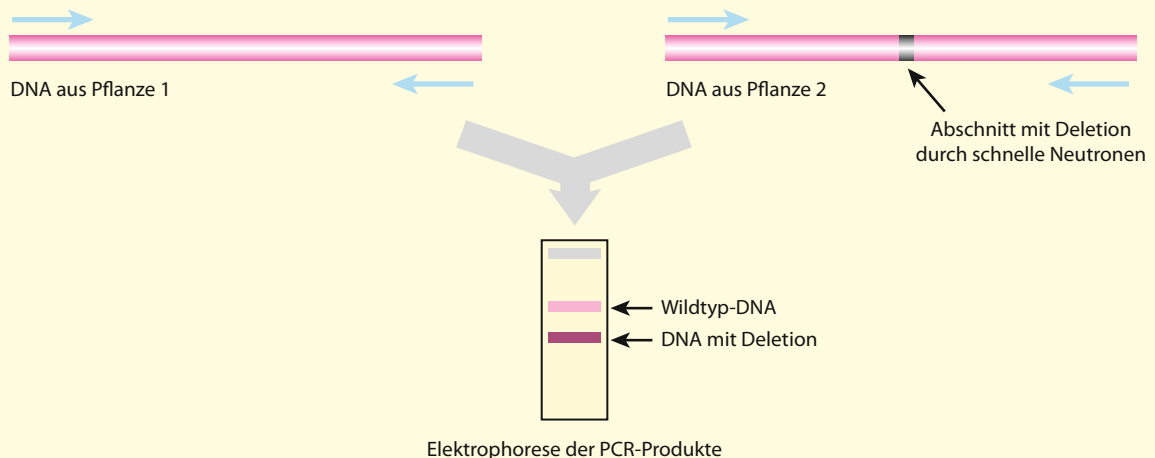
Die Samen all dieser Pflanzen, als M2-Samen bezeichnet, werden geerntet. Die meisten davon werden als Samenvorrat aufbewahrt, aus den übrigen M2-Samen zieht man Pflanzen. Anschließend isoliert man die DNA der Pflanzen und sammelt sie in Pools unterschiedlicher Größe. Enthielt zum Beispiel der Originalpool die DNA von 100 Pflanzen, so erzeugt man nach und nach kleinere Pools bis hinunter zu nur einer bis zwei Pflanzen pro Pool. Mittels PCR

a Erzeugen von Samenvorräten mit mutierter DNA

schnelle Neutronen



b Analyse der DNA auf Deletionen



14.16 Identifizieren von Mutanten, die durch schnelle Neutronen erzeugt wurden, mittels PCR

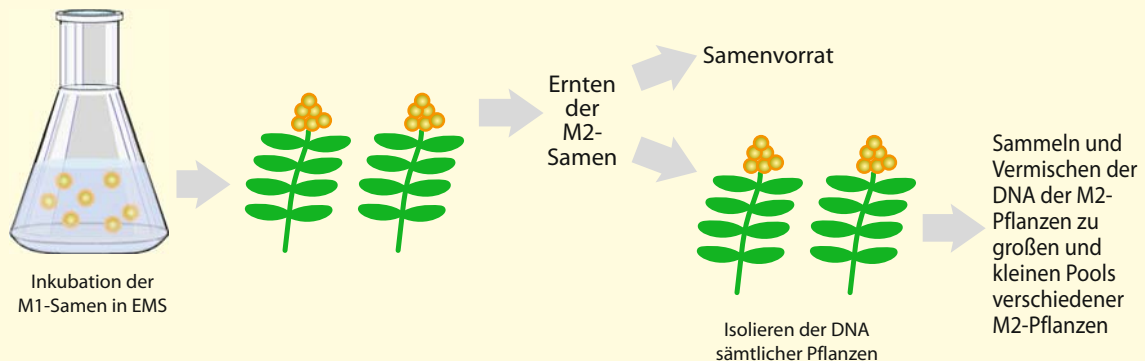
a M1-Samen werden durch schnelle Neutronen einer Mutagenese unterzogen. Aus den M2-Samen werden Pflanzen gezogen, und von jeder Pflanze wird die DNA isoliert. Die DNA wird zu großen Pools aus vielen M2-Samen vermischte und nach und nach zu kleineren Pools aus weniger Samen. **b** Mittels PCR analysiert man die Samen auf Deletionen. Die Primer erkennen spezifische Stellen im Pflanzengenom. Enthält der DNA-Pool Deletionen, so erzeugt der PCR-Primer zwei Banden, eine von dem (in der Länge unveränderten) Wildtypgen und eine von der Pflanze mit der Deletion.

versucht man dann in der Regel, spezifische Gene mit Deletionen zu finden. Dazu werden PCR-Primer hergestellt, um ein Zielgen aus dem größten DNA-Pool zu amplifizieren. Wurde im Zielgen einer der Pflanzen eine Deletion erzeugt, so werden die PCR-Primer zwei Banden amplifizieren, das Wildtypgen plus einen kürzeren Abschnitt von dem Gen mit der Deletion. Anschließend werden die kleineren DNA-Pools auf die Deletion hin analysiert, bis man einen

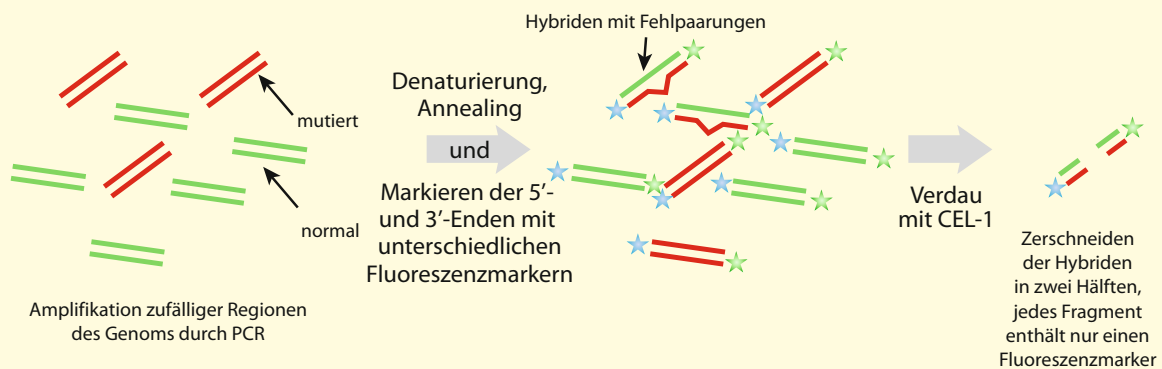
bestimmten M2-Samen mit der genetischen Deletion in Verbindung bringen kann (Abb. 14.16).

Eine weitere Methode, um Mutationen bei Pflanzen zu erzeugen, ist das sogenannte **TILLING** (von engl. *targeting-induced local lesions in genomes*; Abb. 14.17). Dazu erzeugt man zunächst bei einer Reihe von Samen durch Inkubation mit einer mutagenen Verbindung wie EMS (Ethylmethansulfonat) Punktmutationen. Durch EMS entstehen in der DNA

a Erzeugen von Punktmutationen mit EMS



b Identifizieren von Punktmutationen



14.17 Identifizieren von Punktmutationen mittels TILLING

Mit der Methode des TILLING kann man Punktmutationen in einer pflanzlichen DNA-Bibliothek identifizieren. **a** Die mutagene Verbindung EMS induziert Punktmutationen in Samen. Aus den M1-Samen werden Pflanzen gezogen, die M2-Samen werden geerntet. Die meisten M2-Samen bewahrt man als Vorrat auf, die übrigen lässt man keimen. Aus sämtlichen daraus hervorgehenden Pflanzen wird die DNA isoliert und in Pools aufgeteilt. Die größeren Pools enthalten DNA aus allen M2-Pflanzen, die kleineren nur DNA von einer oder zwei M2-Pflanzen. **b** Zur Identifizierung von Punktmutationen in den DNA-Pools amplifiziert man mittels PCR zufällige Abschnitte des pflanzlichen Genoms. Einige der PCR-Produkte enthalten Punktmutationen, andere sind normal. Nun unterzieht man die Produkte einer Denaturierung; beim anschließenden Annealing bilden auch einige der mutierten und normalen Stränge Hybriden. Die renaturierten PCR-Produkte werden an beiden Enden mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markiert. Danach werden die PCR-Produkte mit dem Enzym CEL-1 verdaut. Dieses schneidet nur an Stellen der Helix, an denen Fehlpaarungen auftreten. Dadurch weisen sämtliche verbleibenden „mutiert-normal-Hybriden“ nur noch einen einzigen Fluoreszenzmarker auf.

G/C- und A/T-Transitionen. Wie zuvor werden aus den M1-Samen Pflanzen gezogen, und die Samen der zweiten Generation (M2-Samen) werden größtenteils als Samenvorrat aufbewahrt. Einige M2-Samen lässt man keimen, isoliert die DNA der Pflanzen und stellt daraus einen großen Megapool und nach und nach kleinere Pools zusammen, wie zuvor beschrieben. Mithilfe von PCR-Primern werden dann ausgewählte Abschnitte der DNA amplifiziert. Die PCR-Primer

tragen Fluoreszenzmarker. Folglich sind die PCR-Produkte an beiden Enden jeweils mit einem anderen Marker markiert.

Die Punktmutationen lassen sich (im Gegensatz zu Deletionen) identifizieren, indem man Heteroduplexes aus mutierter und Wildtyp-DNA erzeugt. Dazu werden die PCR-Produkte zu Einzelsträngen denaturiert. Beim anschließenden langsamen Abkühlen vereinigen sich die DNA-Stränge wieder.

Während der Renaturierung vereinigen sich einige der mutierten Stränge mit Wildtypsträngen, sodass die entstehende Heteroduplex ein fehlgepaartes Nucleotid aufweist. Das Enzym CEL-1 spaltet spezifisch fehlgepaarte DNA. Wird das PCR-Produkt durch CEL-1 gespalten, so besitzt es danach nur noch einen Fluoreszenzmarker, während ungespaltene DNA (ohne Fehlpaarungen) noch beide Fluoreszenzmarker trägt. Durch Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese lassen sich die verdauten mutierten Stränge identifizieren.

Die Funktion pflanzlicher Gene lässt sich beispielsweise durch Disruption zufälliger Gene mittels Einbau von Transposons ermitteln.

Als weitere Methode zur Identifizierung der Funktion pflanzlicher Gene dient Gen-Silencing.

Durch Mutagenese mit schnellen Neutronen kann man in genomischer DNA Deletionen erzeugen, durch die neue Phänotypen entstehen. Mittels PCR lassen sich die Regionen des Genoms finden, in denen die Deletion erfolgt ist.

Durch das sogenannte TILLING (engl. *targeting-induced local lesions in genomes*) entstehen Punktmutationen in pflanzlichen Genomen. Erzeugt die Mutation einen erkennbar mutierten Phänotyp, kann man das Gen durch eine PCR fehlgepaarter Hybriden identifizieren.

Beurteilung der Sicherheit von Nahrungsmitteln und StarLink-Mais

Der Anbau genetisch modifizierter Nutzpflanzen ist sehr umstritten. Zunächst muss man darauf hinweisen, dass sämtliche Nutzpflanzen in irgendeiner Weise genetisch verändert sind. Selbst die ältesten Sorten von essbarem Mais weisen beispielsweise keine Ähnlichkeit mit ihrem Vorfahren Teosinte auf. Diese Veränderungen wurden durch Fremdbestäubung und selektive Züchtung erzeugt. Daher ist es richtiger, hier von *transgenen Nutzpflanzen* statt von *genetisch modifizierten Nutzpflanzen* zu sprechen.

Besondere Besorgnis rufen transgene Nutzpflanzen im Hinblick auf ihre Wirkung auf die Gesundheit hervor. Enthält die transgene Nutzpflanze Toxine oder Allergene, ändert sich der Nährstoffgehalt des Nahrungsmittels, oder begünstigt sie eine Antibioti-

karesistenz bei Mensch oder Vieh? Die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen durch Reportergene oder selektierbare Marker stellt inzwischen kein Problem mehr dar, weil die neuen transgenen Sorten diese Marker nicht mehr enthalten. Der Nährstoffgehalt transgener Nahrungsmittel wird streng kontrolliert und bewertet, bevor eine Freigabe für die Öffentlichkeit erfolgt.

Das allergene Potenzial transgener Nutzpflanzen hat zahlreiche Debatten hervorgerufen. Im Jahr 2000 entdeckte man in Tacos aus einem Supermarkt in den USA eine für Nahrungsmittel nicht zugelassene transgene Maissorte, den **StarLink-Mais**. StarLink-Mais enthält zwei Transgene. Eines davon codiert für das Toxin aus *Bacillus thuringiensis* und verleiht dadurch eine Resistenz gegen den Maiszünsler (s. weiter vorne). Bei diesem Bt-Transgen handelt es sich um die Cry9C-Isoform. Das zweite Transgen aus *Streptomyces hygroscopicus* macht den Mais resistent gegen ein häufig verwendetes Breitspektrumherbizid.

Die Cry9C-Isoform des Bt-Toxins ist sehr viel resistenter gegen Magensäure. Nach Kochen und Weiterverarbeitung enthielt StarLink-Mais ebenfalls sehr viel höhere Konzentrationen des Cry9C-Proteins, als erwartet. Das deutet darauf hin, dass dieses Protein stabiler als andere Isoformen des Bt-Toxins ist. (Die Cry1A-Isoform des Bt-Toxins wird hingegen durch Kochen, Verarbeitung und Verdauungsenzyme problemlos abgebaut.) Weil die Ergebnisse für das Cry9C-Protein aus nur einer Studie stammten, forderte die amerikanische Umweltschutzorganisation EPA (Environmental Protection Agency) weitere Tests, um sicherzustellen, dass der Verzehr keine allergischen Reaktionen hervorruft. Die Firmen, die StarLink-Mais herstellten, drängten die EPA auf Zulassung. Diese wurde nur teilweise erteilt: Als Futter für Vieh durfte StarLink-Mais angebaut werden. Die EPA hatte nicht bedacht, dass der geerntete Mais zum nächsten Getreidesilo transportiert und dort mit sämtlichem anderen Mais der Region vermischt wird und danach in die Verarbeitungszentren gelangt. So befolgten Herstellerfirma und Landwirte zwar in gutem Glauben die Richtlinien der EPA, der nächste Schritt in der Weiterverarbeitung machte es jedoch unmöglich, den StarLink-Mais von all den anderen Sorten zu trennen.

Im September 2000 schlossen sich mehrere Gruppen zu einem gemeinsamen Protest gegen genetisch modifizierte Nahrungsmittel zusammen und gaben bekannt, in Tacos Spuren von StarLink-Mais nachgewiesen zu haben. Weitere Untersuchungen

bestätigten dies, sodass sämtliche Produkte vom Markt genommen werden mussten. Die Gesundheitsbehörde CDC (Centers for Disease Control) untersuchte alle Menschen, die über eine allergische Reaktion nach Verzehr der kontaminierten Tacos klagten. Als Erstes stellten sie fest, welchen Antikörper der Körper als Reaktion auf Cry9C-Protein produziert. Danach nahmen sie Blutproben und codierten diese. Diese Proben wurden dann sowohl vom CDC als auch von einem anderen Labor auf die Anwesenheit des Cry9C-Antikörpers untersucht. Beide kamen zu dem Ergebnis, dass keine der Proben diese Antikörper enthielt. Das ließ darauf schließen, dass die allergischen Reaktionen auf irgendeinen anderen Bestandteil der verzehrten Nahrung zurückzuführen waren.

Anschließend bot die Firma an, sämtlichen noch vorhandenen StarLink-Mais zurückzukaufen und den Landwirten einen guten Preis dafür zu bieten, damit keine Nahrungsmittel mehr kontaminiert würden. Zusätzlich wurde sämtliches StarLink-Saatgut vom Markt genommen, um einen künftigen Anbau zu verhindern. Insgesamt war StarLink nur zwei Jahre lang auf dem Markt, 1999 und 2000. Im Jahr 1999 belief sich der StarLink-Anbau in den Vereinigten Staaten auf nur 0,4 % des gesamten Maisanbaus, im Jahr 2000 auf 0,5 %. Aufgrund dieses geringen Prozentsatzes der Gesamternte machte das Cry9C in den Tacos durch den hohen Anteil anderer Maissorten nur einen sehr kleinen Anteil aus. Mittlerweile wird StarLink-Mais nirgendwo auf der Welt mehr angebaut, und die EPA hat sämtliche Zulassungen aufgehoben.

Das allergische Potenzial zu ermitteln, ist bei der Entwicklung transgener Nutzpflanzen von entscheidender Bedeutung. In einem anderen Fall hat man Sojabohnenpflanzen mit einem Gen aus der Paranuss transformiert. Das Gen sollte den Methioningehalt der Sojabohnen erhöhen und damit ein besseres Viehfutter ergeben. Weil viele Menschen gegen Paranüsse allergisch sind, ordnete die amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration) Allergietests in Form von Pricktests und Immunassays an. Dabei wurde festgestellt, dass das Transgen allergische Reaktionen hervorruft. Daraufhin wurden die Forschungen eingestellt, und keine der transgenen Pflanzen gelangte je an die Öffentlichkeit.

Transgene Pflanzen stehen unter strenger Kontrolle der Öffentlichkeit und der Regierung.

Bt-Toxin und Schmetterlinge

Als weiteres Problem transgener Pflanzen kommt hinzu, dass sie sich auch auf **Nicht-Zielorganismen** auswirken können, also auf Pflanzen und Tiere, die der transgenen Nutzpflanze oder dem Insektizid unabsichtlich ausgesetzt sind. In einem Artikel in der Zeitschrift *Nature* wurde die Möglichkeit angedeutet, dass Monarchfalter sterben, wenn sie Pollen von Mais mit dem Bt-Gen aufnehmen. Diese Studie alarmierte Wissenschaftler ebenso wie Umweltlobbyisten. Die Raupen der Monarchfalter verbringen den Sommer in Teilen von Kanada und im Mittelwesten der USA und ernähren sich ausschließlich von Seidenpflanzen. Im Herbst wandern die adulten Falter in ihre Überwinterungsgebiete in Mexiko. Im Frühjahr ziehen sie dann zur Eiablage wieder zurück in den Mittelwesten, und der Zyklus beginnt von vorne. Für ihr Experiment brachten die Wissenschaftler der Cornell University Pollenstaub von transgenem Mais mit exprimiertem Bt-Toxin auf die Blätter der Seidenpflanzen auf. Zum Vergleich bestäubten sie andere Seidenpflanzen mit normalem Pollen, weitere gar nicht. Die Raupen, die von dem transgenen Pollen gefressen hatten, zeigten ein verkümmertes Wachstum, nahmen weniger Nahrung zu sich und hatten eine höhere Sterblichkeit als Raupen der anderen beiden Gruppen.

An dieser Studie gab es viele strittige Punkte. So wurde beispielsweise nie deutlich, wie viel Pollen tatsächlich auf die Seidenpflanzen aufgebracht wurde. Die Forscher trugen einfach so viel Pollen auf, wie sie in den Maisfeldern fanden. Da die Raupen zudem die mit Bt-Pollen bestäubten Seidenpflanzenblätter häufig verschmähten, argumentierten einige Kritiker, dass sie in der natürlichen Umgebung auf andere Seidenpflanzen ausgewichen wären. Umweltgruppen empfanden dies als eine bahnbrechende Studie, die zeigte, dass transgene Nutzpflanzen für die Umwelt genauso schädlich sein können wie Pestizide wie DDT. Das beste Ergebnis der Debatte war jedoch die Vielzahl nachfolgender Forschungen über transgene Bt-Pflanzen und ihre Wirkungen auf Schmetterlinge und andere Nicht-Zielorganismen.

Man ermittelte die Menge an Pollen auf Maisfeldern und in deren Umgebung wachsenden Seidenpflanzen. Damit sich die Bt-Pollen auf die Raupen von Monarchfaltern auswirken, müssen 100 Pollenkörner pro Quadratzentimeter vorhanden sein. So

viel Pollen fand sich nur auf Seidenpflanzen, die direkt am Rand oder sogar innerhalb von Maisfeldern wuchsen, aber nie auf benachbarten offenen Flächen. Schon in einer Entfernung von zwei Metern vom Rand des Maisfeldes fiel die Pollendichte auf 14 Körner pro Quadratzentimeter. In der natürlichen Umgebung fressen die Monarchraupen so stark mit Pollen überzogene Blätter einfach nicht, sondern beschränken sich auf andere Pflanzenteile. Die Zahl der Pollen wird zudem stark davon beeinflusst, ob es während der Freisetzung der Pollenkörner regnet oder windig ist. Durch einen einzigen Regenschauer können mehr als die Hälfte der Pollenkörner von den Pflanzen heruntergewaschen werden. Außerdem legen Monarchfalter, sofern sie die Wahl haben, ihre Eier auf Seidenpflanzen ohne Pollen ab, was das Risiko einer Schädigung noch weiter verringert.

Man hat auch versucht, durch gezielte Untersuchungen festzustellen, welche Formen von Bt-Toxinen die Larven der Monarchfalter schädigen. Dabei erwiesen sich nur bestimmte Typen von Bt-Toxinen als schädlich, andere hingegen als völlig harmlos. Stets toxisch war lediglich Pollen von Cry1AB, Ereignis #176; diese Sorte machte im Jahr 2000 etwa 1 % der gesamten Maisernte aus. Schon 2001 wurde dieses transgene Ereignis nicht mehr zugelassen und die Sorte in den USA nicht mehr angebaut. Das Cry1AB-Transgen von Ereignis #176 untersteht der Kontrolle eines Maispollen-spezifischen Promotors und eines Promotors von Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, der die Expression aller photosynthetischen Gewebe sichert. Andere Ereignisse, die dasselbe Toxin – Cry1AB – nutzen, waren nur dann toxisch für die Monarchraupen, wenn sie in einer Dichte von mehr als 1000 Pollenkörnern pro Quadratzentimeter auftraten. Die geringere Toxizität beruht auf der Verwendung unterschiedlicher Promotoren. Andere Cry-Toxine wie Cry1F und Cry9C zeigten keinerlei Auswirkungen auf irgendwelche Larvenstadien des Monarchfalters. Diese Studien wurden im Labor durchgeführt, wo die Raupen keine andere Wahl hatten, als die mit Pollen kontaminierten Seidenpflanzen zu fressen.

Bei einigen Studien hat sich eine schädliche Wirkung transgener Maispollen auf Monarchfalter ergeben. Allerdings wurden diese Studien im Labor durchgeführt, das sich stark von den Bedingungen in einem Maisfeld unterscheidet. Um eine wirklich aussagekräftige Schlussfolgerung zu ermöglichen, sind weitere Untersuchungen in der tatsächlichen Umgebung erforderlich.

► Weiterführende Literatur

- Aljanabi S (2001) Genomics and plant breeding. *Biotechnol Annu Rev* 7: 195–238
- Bent AF (2000) *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol* 124: 1540–1547
- Chua N-H, Tingey SV (2006) Plant biotechnology: Looking forward to the next ten years. *Curr Opin Biotechnol* 17: 103–104
- Clark DP (2006) *Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. Understanding the Genetic Revolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Denby K, Gehring C (2005) Engineering drought and salinity tolerance in plants: Lessons from genome-wide expression profiling in *Arabidopsis*. *Trends Biotechnol* 23: 547–552
- Dodds JH, Roberts LW (1987) *Experiments in Plant Tissue Culture*, 2. Aufl. Cambridge University Press, New York
- Garg AK, Kim J-K, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15898–15903
- Gatehouse AMR, Ferry N, Raemaekers RJM (2002) The case of the monarch butterfly: A verdict is returned. *Trends Genet* 18: 249–251
- Hellmich RL, Siegfried BD, Sears MK, Stanley-Horn DE, Daniels MJ, Mattila HR, Spencer T, Bidne KG, Lewis LC (2001) Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis* purified proteins and pollen. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11925–11930
- Koornneef M, Dellaert LWM, van der Veen JH (1982) EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mut Res* 93: 109–123
- Krämer U (2005) Phytoremediation: Novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr Opin Biotechnol* 16: 133–141
- Leister D (Hrsg.) (2005) *Plant Functional Genomics*. Food Products Press, New York
- Li X, Song Y, Century K, Straight S, Ronald P, Dong X, Lassner M, Zhang Y (2001) A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. *Plant J* 27: 235–242
- Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W, Cai Y, Kennelley ED (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409: 579
- Nair RS, Fuchs RL, Schuette SA (2002) Current methods for assessing safety of genetically modified crops as exemplified by data on Roundup Ready soybeans. *Toxicol Pathol* 30: 117–125
- Penna S (2003) Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci* 8: 355–357
- Tzfira T, Citovsky V (2002) Partners-in-infection: Host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol* 12: 121–129
- Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJJ, Farrand SK, Winans SC (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* 182: 3885–3895

Transgene Tiere

Neue und verbesserte Tiere

Das Erzeugen transgener Tiere

Größere Mäuse veranschaulichen die transgene Technologie

Produktion rekombinanter Proteine durch transgene Kühe

Knockout-Mäuse für die medizinische Forschung

Alternative Methoden zur Produktion von transgenen Tieren

Positionseffekte bei der Expression von Transgenen

Konkurrierende Positionseffekte bei der Expression von Transgenen

Zielgerichteter Einbau des Transgens an einer bestimmten Stelle

Gezielte Kontrolle der Expression von Transgenen

- Induzierbare endogene Promotoren

- Rekombinante Promotorsysteme

- Transgenregulation über Steroidrezeptoren

Regulation durch sequenzspezifische Rekombination mit Cre oder Flp

Transgene Insekten

Genetisch modifizierte Stechmücken

Klonen von Tieren durch Kerntransplantation

Das Klonschaf Dolly

Praktische Gründe für das Klonen von Tieren

Verbesserung von Nutztieren durch Stoffwechsel-Engineering

Probleme und ethische Fragen bei der Kerntransplantation

Genetisches Imprinting und Entwicklungsprobleme bei geklonten Tieren

Transgene Menschen, andere Primaten und Haustiere

Anwendung der RNA-Technologie in der Transgenik

Anwendungsmöglichkeiten der RNA-Interferenz in der Transgenik

Transgenik und Aufnahme von DNA in der Natur

Weiterführende Literatur

Neue und verbesserte Tiere

Der Mensch versucht schon seit Jahrtausenden, Nutzpflanzen und Nutztiere durch selektive Züchtung, überwiegend nach dem Prinzip von Versuch und Irrtum, zu verbessern. Durch selektive Züchtung über viele Generationen hinweg wurden Schafe mit dichter Wolle und schlauere Schäferhunde gezüchtet. Je mehr Erkenntnisse sich auf dem Gebiet der Genetik ansammeln, desto schneller und effektiver lassen sich verbesserte Nutzpflanzen und -tiere züchten.

Mittlerweile kann man Pflanzen, Tiere und sogar Menschen durch gentechnische Methoden verändern. Die ersten Versuche mit transgenen Tieren wurden größtenteils an Mäusen durchgeführt. Inzwischen haben auch weitaus größere Tiere in der Gentechnik Einzug gehalten, beispielsweise Schafe, Ziegen, Katzen, Hunde und selbst Affen. Bei einem **transgenen Tier** trägt jede Zelle neue genetische Informationen. Mit anderen Worten, die neue genetische Information wird in die Keimbahn eingeschleust und nicht nur in die somatischen Zellen wie bei der Gentherapie (die das Thema von Kap. 17 ist). Folglich geben transgene Tiere diese neuen Gene an ihre Nachkommen weiter.

Im Allgemeinen besteht diese neue genetische Information aus Genen, die von anderen Organismen übertragen wurden. Man spricht von sogenannten **Transgenen**. Sie können von Vertretern der gleichen Art stammen, von entfernt verwandten Tieren oder sogar von gar nicht verwandten Organismen wie Pflanzen, Pilzen oder Bakterien. Oft werden die Transgene auch selbst schon modifiziert, bevor man sie in das Wirtstier einbaut. Zu den häufigsten Modifikationen gehört, dass das Transgen der Regulation eines geeigneteren Promotors unterstellt wird. Das kann ein stärkerer Promotor sein oder auch ein Promotor, durch den das Transgen unter bestimmten Bedingungen exprimiert wird. Diese verschiedenen Manipulationen wurden in den vorherigen Kapiteln behandelt. Hier geht es nun um die Techniken, mit denen transgene Tiere erzeugt werden, sowie um einige Anwendungen dieser Technologie.

Der Mensch verändert schon seit Tausenden von Jahren Tiere durch selektive Züchtung. Heute kann man auch Fremdgene einbauen und auf diese Weise transgene Tiere mit verbesserten Eigenschaften erzeugen.

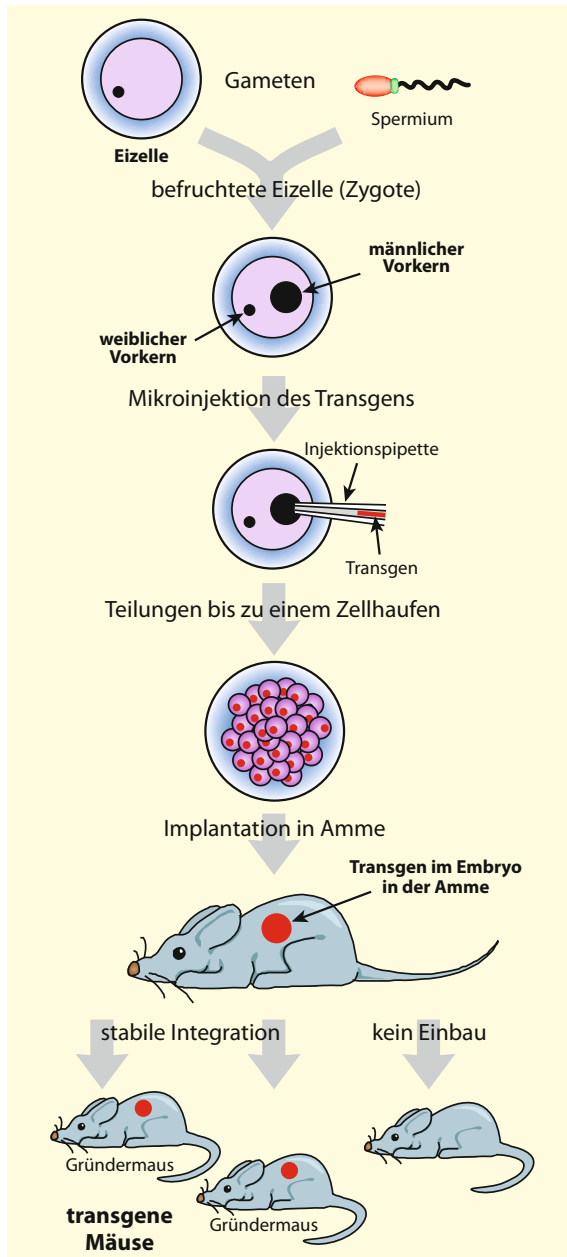
Das Erzeugen transgener Tiere

Hat man ein geeignetes Transgen zur Verfügung, kann man mittels **Mikroinjektion** in den Zellkern ein transgenes Tier erzeugen. Dabei geht man normalerweise folgendermaßen vor:

1. Man injiziert das Transgen in befruchtete Eizellen (Zygoten) (Abb. 15.1). Direkt nach der Befruchtung enthält die Zygote ihren ursprünglichen weiblichen Zellkern plus den männlichen Zellkern aus dem erfolgreich eingedrungenen Spermium. Kurz darauf verschmelzen diese beiden **Vorkerne (Pronuclei)**. Bevor dies geschieht, injiziert man die DNA in den männlichen Vorkern, denn dieser ist größer und somit besser für die Mikroinjektion geeignet. Für eine solche Mikroinjektion benötigt man spezielle Hilfsmittel und viel Geschick. Die Erfolgsrate schwankt je nach Labor zwischen 5 % und 40 %.
2. Während der ersten Teilungen der Embryonalentwicklung wird die Eizelle in einer Zellkultur aufbewahrt.
3. Anschließend wird der gentechnisch modifizierte Embryo in den Uterus eines weiblichen Tieres, der **Amme**, implantiert. Hier erfolgt dann die weitere Entwicklung zu Embryonen, und – sofern alles glatt verläuft – zu neugeborenen Tieren.
4. Bei einem Teil der neugeborenen Tiere ist das Transgen stabil in ihr Chromosom integriert. Bei anderen hat es hingegen nicht funktioniert, und das Transgen ist verloren gegangen. Die Tiere, die das Transgen stabil eingebaut haben, bezeichnet man als **Gründertiere**. Durch Verpaarung eines männlichen und eines weiblichen Gründertieres kann man eine neue transgene Linie von Tieren gründen, die zwei Kopien des Transgens besitzen (Abb. 15.1). Man beachte, dass die Gründertiere selbst nur eine einzelne Kopie des Transgens auf einem Chromosom aufweisen und somit heterozygot für das Transgen sind.

Verpaart man zwei solche Gründertiere miteinander, so werden 25 % der Nachkommen zwei Kopien des Transgens aufweisen und homozygot sein, 25 % werden keine Kopie des Transgens besitzen und die übrigen 50 % nur eine Kopie. Den größten Nutzen bieten homozygote transgene Tiere, denn wenn man mit ihnen weiterzucht, werden sämtliche Nachkommen beide Kopien des Transgens erhalten.

Der Zeitpunkt des Einbaus der injizierten DNA in den männlichen Vorkern ist einigen Schwankungen



15.1 Erzeugen transgener Tiere durch Mikroinjektion

Um transgene Tiere zu erzeugen, führt man zunächst mit entnommenen Ei- und Spermienzellen eine *in vitro*-Fertilisation durch. Vor Verschmelzen der Vorkerne injiziert man in den männlichen Vorkern das Transgen. Der Embryo verbleibt noch für einige Teilungen in Kultur und wird dann in eine Maus implantiert. Diese „Amme“ wurde zuvor einer Hormonbehandlung unterzogen, damit sie den Embryo nicht abstößt und weiter austrägt. Die neugeborenen Nachkommen werden dann auf eine stabile Integration des Transgens untersucht. Gründermäuse besitzen nur eine Kopie des Transgens.

unterworfen. In manchen Fällen wird die DNA mehr oder weniger sofort eingebaut, sodass sämtliche Zellen des daraus entstehenden Tieres das Transgen enthalten. Seltener erfolgen vor dem Einbau der DNA zunächst mehrere Zellteilungen. Dadurch entsteht dann eine **Chimäre**, also ein Tier, bei dem einige Zellen das Transgen enthalten und andere nicht. Bisweilen werden auch mehrere Tandemkopien des Transgens in denselben Kern eingebaut. Da solche Konstrukte häufig instabil sind, werden die zusätzlichen Kopien im Laufe der folgenden Generationen oft wieder beseitigt. Der Einbau der injizierten DNA in die Chromosomen der Wirtszelle erfolgt nach dem Zufallsprinzip, oft einhergehend mit einer Umordnung der chromosomalen DNA in der Umgebung. Das lässt darauf schließen, dass die DNA häufig an Stellen spontaner Chromosomenbrüche eingebaut wird.

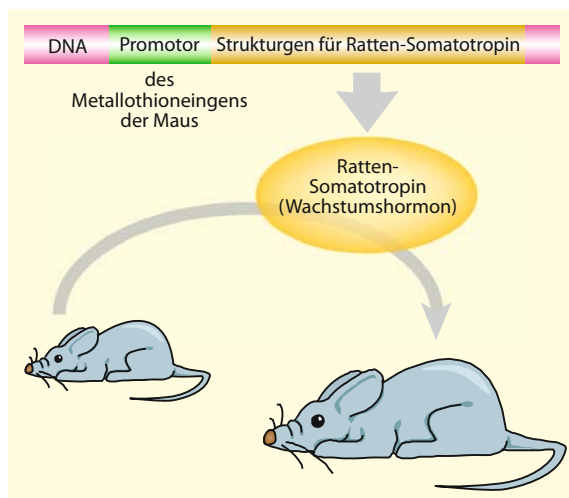
Transgene Tiere werden häufig durch Mikroinjektion von DNA in den Kern einer befruchteten Eizelle erzeugt. Aus derart modifizierten Eizellen hervorgehende Gründertiere besitzen eine Kopie des Transgens. Um Tiere zu erhalten, die homozygot für das Transgen sind, muss man diese Gründertiere untereinander kreuzen.

Größere Mäuse veranschaulichen die transgene Technologie

Als klassisches Beispiel zur Veranschaulichung der transgenen Technologie erzeugte man durch den Einbau des Gens für das Wachstumshormon von Ratten größere Mäuse. Wachstumshormon oder **Somatotropin** besteht aus einem einzelnen Polypeptid, das von einem einzelnen Gen codiert wird. Im Jahr 1982 klonierte man das Somatotropin von Ratten und injizierte es in befruchtete Mauseizellen. Diese Eizellen implantierte man in Ammenmäuse, welche die genetisch modifizierten Mäuse austrugen. Diese transgenen Mäuse erreichten zwar nicht die Größe von Ratten, waren aber etwa doppelt so groß wie normale Mäuse. Zum ersten Mal wurde damit ein Gen, das von einem Tier auf ein anderes übertragen worden war, nicht nur stabil weitervererbt, sondern es funktionierte auch mehr oder weniger normal.

Um das Somatotropin der Ratte zu exprimieren, unterstellte man es der Kontrolle des Promotors

des nicht verwandten Mausgens **für Metallothionein**, das normalerweise in der Leber exprimiert wird (Abb. 15.2). Dadurch wurde das Ratten-Somatotropin nicht wie eigentlich für das Wachstumshormon üblich in der Hypophyse produziert, sondern in der Leber der transgenen Mäuse. Trotz dieser Produktion



15.2 Transgene Riesenmäuse

Mittels eines DNA-Konstrukts, welches das Gen für Somatotropin von Ratten unter der Kontrolle des Metallothionein-Promotors der Maus enthielt, erzeugte man eine transgene Maus. Durch die Wirkung des Transgens wuchs die Maus auf das Doppelte der normalen Körpergröße an.

am „falschen“ Ort erfüllte das Gen seine Funktion und ließ die Mäuse größer werden. Auch menschliches Somatotropin wurde in Mäusen exprimiert und führte ebenfalls zu einem Größenzuwachs.

Die Größe hängt jedoch nicht ausschließlich vom Wachstumshormon ab. Durch defekte Wachstumshormonrezeptoren wird das Wachstum zum Beispiel gehemmt. Die afrikanischen Pygmäen werden nur selten größer als 1,50 Meter, haben jedoch einen normalen Somatotropinspiegel. Offenbar sind bei den Pygmäen die Rezeptoren für das Wachstumshormon defekt. Diese binden das im Blut zirkulierende Somatotropin normalerweise und sind erforderlich, damit das Hormon auf seine Zielgewebe einwirken kann. Minderwuchs bei Nicht-Pygmäen kann entweder auf Defekte bei der Produktion von Somatotropin zurückzuführen sein oder auf einen Mangel an entsprechenden Rezeptoren. Durch Hormonmangel hervorgerufener Minderwuchs wird heute mit **rekombinantem humanem Somatotropin (rHST)** behandelt. Minderwuchs aufgrund eines Mangels an Rezeptoren kann man bislang noch nicht erfolgreich behandeln.

Bei einem der ersten transgenen Experimente injizierte man Mäusen das Gen für das Wachstumshormon von größeren Tieren. Exprimiert wurde es unter der Kontrolle des Metallothionein-Promotors, sodass man die Expression durch Spuren von Zink auslösen konnte. Das führte zu einer Größenzunahme der Mäuse.

Exkurs 15.1

Im Trend: transgene Mäuse

Genetisch modifizierte Mäuse sind der letzte Schrei und kommen immer wieder in die Schlagzeilen:

Die „**Marathon-Maus**“ kann bis zu 1800 Meter laufen, bevor sie erschöpft ist, und damit doppelt so weit wie eine normale Maus. Zurückzuführen ist das auf einen aktivierten Regulator – PPAR-delta – mehrerer an der Fettverbrennung und Muskelentwicklung beteiligter Gene.

Der „**Mighty Mouse**“ fehlt durch gentechnische Modifikation das Protein Myostatin, welches das Wachstum der Muskeln verlangsamt. Infolgedessen kommt es zu einer enormen Muskelentwicklung. Es gibt einen bekannten menschlichen Fall eines Gendefekts, der zu einem Fehlen von Myostatin führte. Der im Jahr 2000 in Berlin geborene Junge hat doppelt so kräftige Muskeln wie andere Kinder seines Alters.

Bei der „**Fierce Mouse**“, die außerordentliche Aggressivität zeigt, wurden beide Kopien des *NR2E1*-Gens deletiert (s. auch Kap. 19).

Die „**Smart Mouse**“ zeichnet sich aufgrund genetischer Modifikation durch erhöhte Lernfähigkeit und ein besseres Gedächtnis aus. Sie besitzt zusätzliche Kopien des *NR2B*-Gens. Dieses codiert für den NMDA-Rezeptor in den Synapsen von Nervenzellen im Gehirn.

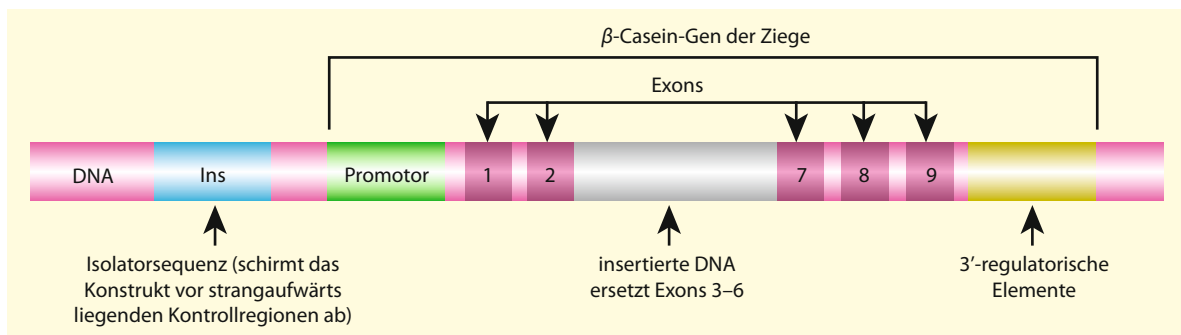
Zu guter Letzt weist die K14-Noggin-Maus ein zusätzliches Noggin-Gen von Hühnern auf. Die Männchen sind besonders dicht behaart und haben einen längeren Penis. Für diese 2004 erzeugte Maus gibt es bislang noch keinen offiziellen Spitznamen.

Die höheren athletischen Fähigkeiten von Marathon-Maus und Mighty Mouse haben die Frage aufgeworfen, ob so auch Manipulationen an Menschen möglich seien – sogenanntes „Gendoping“ –, um bessere sportliche Leistungen zu erzielen. Mehr hierzu findet sich in Kapitel 25 über Bioethik. Man stelle sich nur vor, welche Auswirkungen die Modifikationen der K14-Noggin-Maus haben könnten!

Produktion rekombinanter Proteine durch transgene Kühe

Das Somatotropin aus Kühen wurde kloniert und in Bakterien exprimiert. Dies ermöglicht die Produktion großer Mengen dieses Hormons, das unter der Bezeichnung **rBST (rekombinantes bovines Somatotropin)** bekannt ist. In der Milchindustrie wird das rBST zur Steigerung der Milchleistung eingesetzt. Anders als bei den Mäusen bewirkt der Anstieg des Somatotropinspiegels bei erwachsenen Kühen durch zusätzliche Hormongaben eine erhöhte Milchproduktion statt einer Größenzunahme. Mittlerweile sind schon große Mengen Milch von hormonbehandelten Kühen auf dem Markt.

Derzeit werden zur Produktion der meisten rekombinanten Proteine, etwa humanes Insulin oder Somatotropin, Bakterien wie *Escherichia coli* kultiviert. Die Herstellung solcher Produkte ist kostspielig und erfordert sehr gut ausgebildetes Personal. Billiger könnte es sein, diese Produkte in Rindern zu exprimieren. Milchkühe produzieren pro Jahr rund 10000 Liter Milch, und die Industrie zu deren Transport und Verarbeitung ist bereits vorhanden. Dies macht man sich zunutze und produziert inzwischen mehrere rekombinante Proteine in der Milch transgener Kühe oder anderer landwirtschaftlicher Nutztiere. Dazu unterstellt man klonierte Gene der Kontrolle einer Regulatorregion, die ausschließlich in den Milchdrüsen eine Genexpression zulässt. Deshalb erscheint das Genprodukt in der Milch (Abb. 15.3). Zur Produktion von Proteinen für medizinische Zwecke in kleinerem Maßstab werden häufig Ziegen verwen-



15.3 Konstrukt zur Genexpression in der Milch transgener Ziegen

Um ein rekombinantes Protein in Ziegenmilch zu exprimieren, baut man das interessierende Gen anstelle des Gens für β -Casein ein. Die Expression des Gens erfolgt mit dem endogenen Promotor und 3'-regulatorischen Elementen, welche die Expression von β -Casein auf die Milch der Ziegen beschränken. Das Konstrukt enthält auch Isolatorsequenzen, die verhindern, dass andere regulatorische Elemente die Expression beeinflussen (s. weiter unten).

Exkurs 15.2

Umweltbewusster Schweinemist

Mithilfe der Genetik lassen sich nicht nur Tiere verbessern, sondern auch tierische Abfallprodukte! An der Universität Guelph in Kanada wurde das sogenannte **Enviropig™** geschaffen. In diese transgenen Schweine wurde das *appA*-Gen aus *E. coli* unter der Kontrolle des PSP-Promotors (für engl. *parotid secretory protein*) eingebaut. Dadurch sezernieren sie in ihren Speichel das Enzym Phytase (oder saure Phosphatase, das Produkt von *appA*). Dieses Enzym zersetzt Phytat (Inositolhexaphosphat, das normalerweise in den äußeren Schichten von Getreidekörnern enthalten ist), das Schweine ansonsten nicht verwerten können.

Infolgedessen benötigen diese „umweltbewussten“ Schweine keine zusätzlichen Phosphatgaben in ihrem Futter. Noch viel wichtiger ist jedoch: Der Phosphorgehalt des Schweinemistes wird dadurch um nicht weniger als 60 % gesenkt. Das ist insofern von großer Bedeutung, als der Phosphateintrag aus der Landwirtschaft in Gewässern Algenblüten verursacht. Diese lassen den Sauerstoffgehalt des Wassers absinken und verursachen das Absterben von Fischen und anderen Wasserorganismen.

det. So hat man beispielsweise transgene Ziegen erzeugt, die den **rekombinanten gewebespezifischen Plasminogenaktivator** (rt-PA für engl. *recombinant tissue plasminogen activator*) produzieren; dieser wird zum Auflösen von Blutgerinnseln eingesetzt.

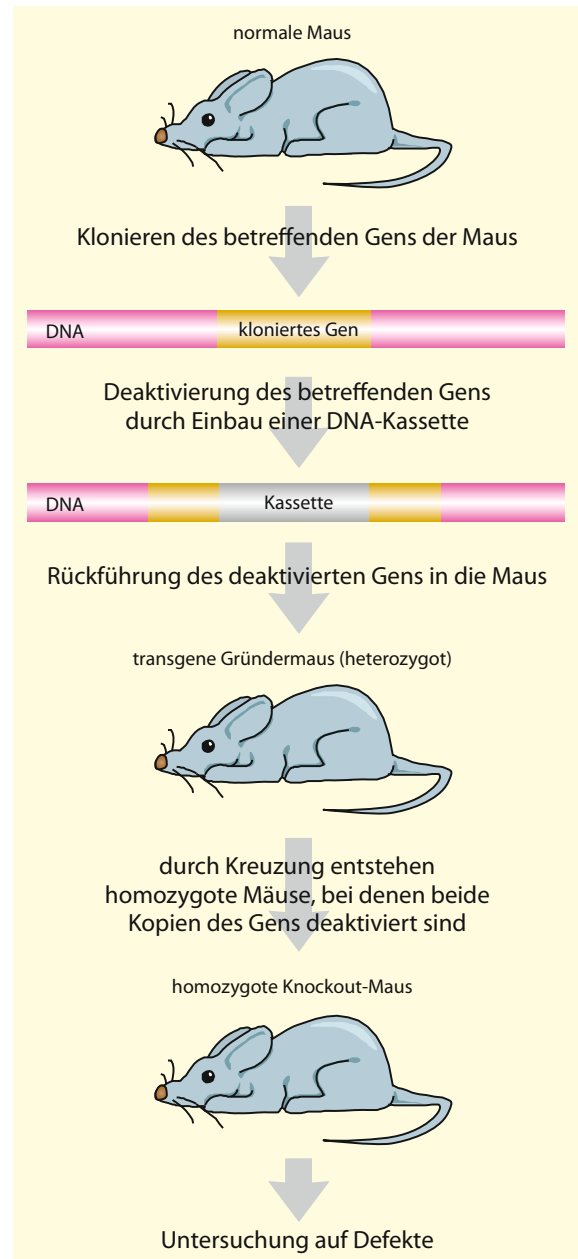
Rekombinante Proteine können durch Expression der entsprechenden Gene in transgenen Rindern oder Ziegen hergestellt werden.

Knockout-Mäuse für die medizinische Forschung

Für genetische Untersuchungen von Erbkrankheiten und Krebs kommt transgenen Tieren, vor allem Mäusen, eine besondere Bedeutung zu. Hierbei ist man weniger daran interessiert, ein kloniertes Transgen einzubauen, als vielmehr die Funktion bereits vorhandener Gene zu ermitteln. Dazu wird das betreffende Gen in der Regel inaktiviert oder „ausgeschaltet“, und anschließend schaut man, welche Defekte dies hervorruft.

Dazu wird das Zielgen zunächst kloniert. Danach sorgt man durch Einbau einer **DNA-Kassette** in dessen codierende Sequenz für eine Disruption des Gens. (Die meisten DNA-Kassetten enthalten zum einfachen Nachweis ein Antibiotikaresistenzgen.) Durch den eingebauten DNA-Abschnitt kann das Gen nicht mehr das richtige Proteinprodukt erzeugen und verliert somit seine Funktion. Diese inaktive Kopie des Gens wird dann mittels der bereits umrissenen Methode zum Einbau von Transgenen wieder in das Tier zurück übertragen. Bisweilen ersetzt diese neu eingeführte DNA mit dem deaktivierten Gen durch homologe Rekombination die vorhandene funktionsfähige Kopie des Gens. Auf diese Weise erhält man Gründermäuse mit einer Kopie des deaktivierten Gens. Kreuzt man diese untereinander, so entstehen Mäuse, bei denen beide Kopien des Gens deaktiviert sind. Diese Mäuse, denen diese Genfunktion völlig fehlt, bezeichnet man als **Knockout-Mäuse** (Abb. 15.4). Handelt es sich bei dem betreffenden Gen um ein lebensnotwendiges, so haben die homozygoten Knockout-Mäuse meist nur eine sehr kurze Lebensdauer.

Bei Knockout-Mäusen wurden ausgewählte Gene gezielt inaktiviert. In der Medizin werden diese Mäuse verbreitet zur Erforschung der Genfunktion eingesetzt.



15.4 Knockout-Mäuse

Wie herkömmliche transgene Mäuse, so werden auch Knockout-Mäuse *in vitro* erzeugt. Das Zielgen wird kloniert und durch Einbau einer DNA-Kassette deaktiviert. Diese Schritte erfolgen normalerweise in Bakterien. Das fertige Konstrukt wird dann während der Befruchtung durch Injektion in den männlichen Vorkern (oder durch andere, später erläuterte Methoden) in die Maus zurück überführt. Nach Geburt der transgenen Nachkommen kreuzt man zwei Heterozygote und erzeugt dadurch homozygote Knockout-Mäuse. An diesen kann man untersuchen, welche Defekte die Inaktivierung des Zielgens hervorgerufen hat.

Alternative Methoden zur Produktion von transgenen Tieren

Neben der Mikroinjektion, der ersten und nach wie vor am häufigsten angewandten Methoden zum Erzeugen transgener Tiere, gibt es noch verschiedene andere Alternativen. Wie in Kapitel 17 erläutert wird, schleust man in der Gentherapie mittels modifizierter Retroviren DNA in die Chromosomen tierischer Zellen ein. Retroviren können auch Zellen früher Embryonalstadien infizieren, beispielsweise embryonale Stammzellen (s. weiter unten). Mit Retroviren als Vektoren könnte man also Transgene einbauen.

Die Verwendung eines Retrovirus hat den Vorteil, dass nur eine einzelne Kopie des Retrovirus plus das Transgen in das Genom eingebaut wird. Zudem benötigt man hierbei nicht die speziellen Fähigkeiten, die für die Mikroinjektion nötig sind. Man fügt der befruchteten Eizelle das Retrovirus mit dem Transgenkonstrukt zu und lässt eine normale Infektion ablaufen. Danach transplantiert man die Eizelle in eine scheinchwangere weibliche Maus. Das weitere Vorgehen gleicht dem bereits beschriebenen.

Nachteilig ist, dass zusammen mit dem Transgen Virus-DNA eingebaut wird und dass Retroviren nur begrenzte Mengen DNA übertragen können. Zudem sind mithilfe von Retroviren erzeugte Gründertiere stets Chimären, da der Einbau des Virus nicht genau zum Zeitpunkt der Verschmelzung der Kerne erfolgt. Aus diesem Grund werden Retroviren nur selten eingesetzt, wenn man vollständig transgene Tiere erzeugen möchte. Andererseits sind auch teilweise transgene Tiere, von denen einige Abschnitte oder Gewebe verändert sind, von Nutzen, weil man die transgenen Gewebe mit den normalen Geweben desselben Tieres vergleichen kann. Damit lassen sich Zweifel beseitigen, ob die verursachten Defekte oder Veränderungen lediglich auf Unterschiede zwischen den Tieren oder tatsächlich auf die Expression des Transgens zurückzuführen sind.

Mithilfe von **embryonalen Stammzellen** kann man ebenfalls transgene Tiere erzeugen. **Stammzellen** sind die Vorläuferzellen bestimmter Gewebe des Körpers. Embryonale Stammzellen entstammen der **Blastocyste**, einem sehr frühen Embryonalstadium. Sie sind in der Lage, sich zu jeglichem Körpergewebe zu differenzieren, auch zu Zellen der Keimbahn. Man kann embryonale Stammzellen kultivieren und wie bei jeder anderen kultivierten Zelllinie DNA einbauen.

Um erfolgreich transgene Tiere erzeugen zu können, muss man die embryonalen Stammzellen in einem Zustand halten, der eine Differenzierung verhindert.

Die modifizierten Stammzellen kann man dann in den zentralen Hohlraum eines frühen Embryos im Blastocystenstadium überführen (Abb. 15.5). Dadurch entsteht ein gemischter Embryo. Das Tier, das sich daraus entwickelt, ist eine genetische Chimäre und besteht teils aus transgenem und teils aus normalem Gewebe.

Stammen Wirtsembryo und die embryonalen Stammzellen von unterschiedlichen genetischen Linien mit verschiedener Fellfärbung, so entstehen Tiere mit einem Fleckenmuster. Dadurch kann man die transgenen Bereiche des Tieres leicht identifizieren. Diese Chimäre, das Gründertier, muss man dann mit einem Tier vom Wildtyp kreuzen. Haben die embryonalen Stammzellen zur Keimbahn beigetragen, so wird das Farbmerkmal dieser Zelllinie auf die Nachkommen übertragen. Bei Mäusen verwendet man häufig die Fellfarben Schwarz (rezessiv) und **Aguti** (graubraun; dominant). Die embryonalen Stammzellen entnimmt man gewöhnlich von der Aguti-Linie, weil sich durch die dominante Fellfarbe die transgenen Zelllinien leicht verfolgen lassen. Sowohl für die embryonalen Stammzellen als auch für die Wirtsembryonen nimmt man in der Regel Männchen, weil die daraus hervorgehenden männlichen Chimären bei der Kreuzung mit Wildtypweibchen zahlreiche Nachkommen zeugen können.

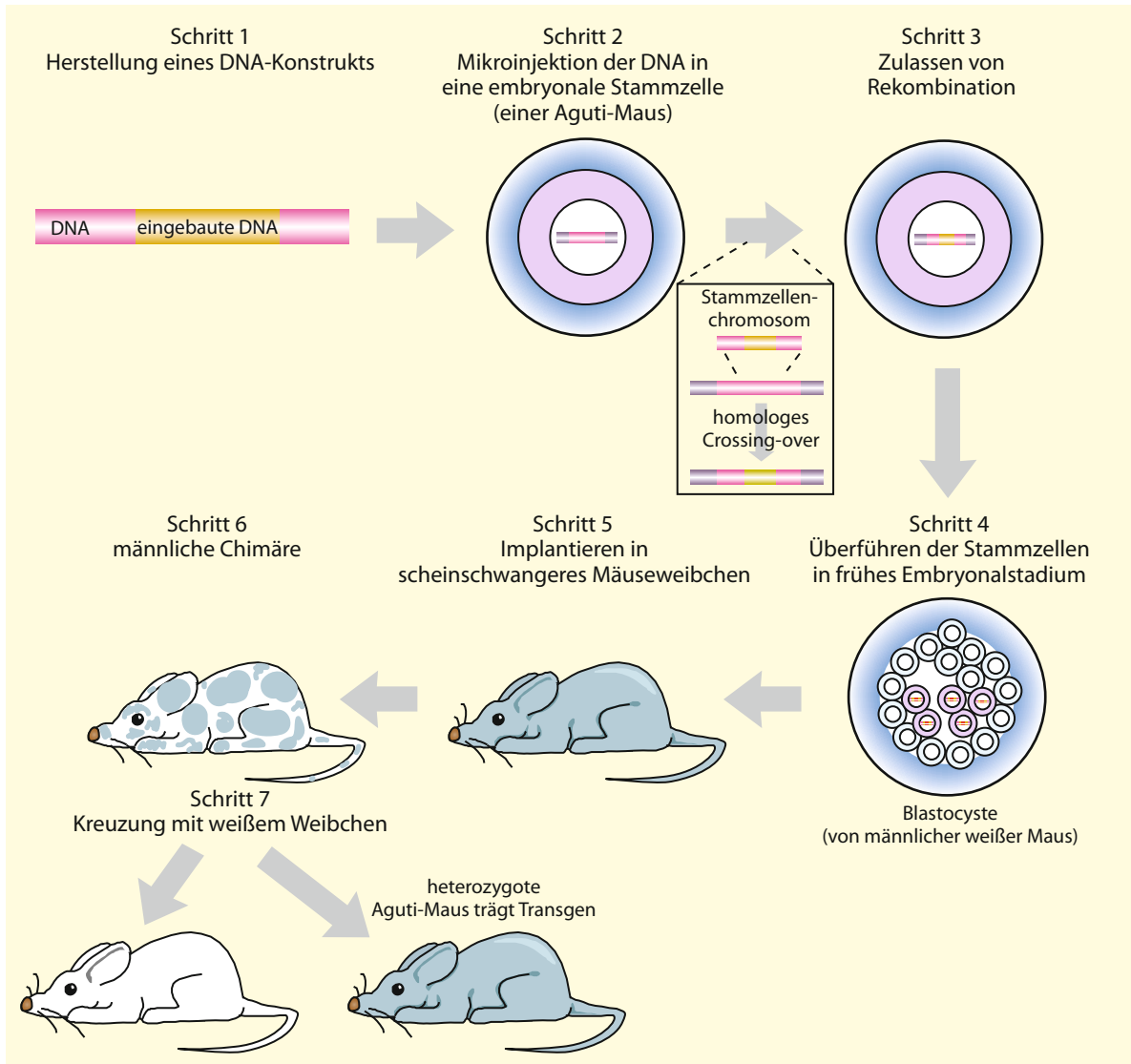
Transgene Tiere lassen sich durch unterschiedliche Methoden erzeugen. Beispielsweise kann man Retroviren als Vektoren verwenden, die sich in die Wirtschromosomen einbauen. Oder man modifiziert embryonale Stammzellen in Zellkultur und überführt sie dann zurück in ein frühes Embryonalstadium.

Positionseffekte bei der Expression von Transgenen

Häufig zeigen transgene Tiere (oder Pflanzen), in die das gleiche Transgen eingebaut wurde, beträchtliche Unterschiede in der Genexpression. Die Expression kann sowohl im Umfang als auch bezüglich des Expressionsmusters in verschiedenen Geweben variieren. Viele dieser Auswirkungen sind auf die Position des Transgens zurückzuführen. Auf die Expression eines eingebauten Transgens können sich sämtliche

regulatorischen Elemente auswirken, die sich in der näheren Umgebung auf dem Chromosom des Wirtstieres befinden. Besonders Enhancer-Sequenzen wirken auch noch über größere Entfernungen und beeinflussen die Expression aller in der Nähe eingebauten Transgene. Ebenso wichtig ist der physikalische Zustand der DNA. Wird das Transgen in eine Region eingebaut, die überwiegend aus Heterochromatin besteht, so wird das Transgen nur schwach oder überhaupt nicht exprimiert werden. In solchen

bauten Transgene. Ebenso wichtig ist der physikalische Zustand der DNA. Wird das Transgen in eine Region eingebaut, die überwiegend aus Heterochromatin besteht, so wird das Transgen nur schwach oder überhaupt nicht exprimiert werden. In solchen



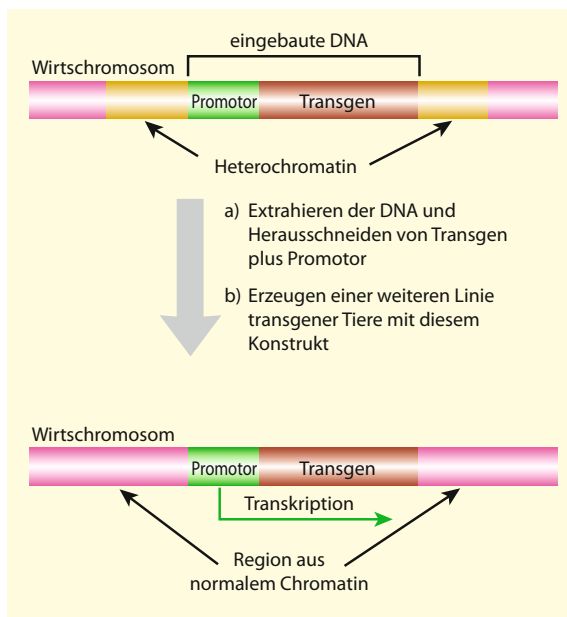
15.5 Verwendung embryonaler Stammzellen

Um mittels embryonaler Stammzellen transgene Tiere zu erzeugen, muss man das Transgen zunächst in diese Stammzellen einbauen. Die hier abgebildeten Stammzellen stammen von einer Aguti-Maus mit graubraunem Fell. Die Stammzellen werden mit dem Transgen transformiert, welches durch homologe Rekombination eingebaut wird. Anschließend injiziert man die Stammzellen in ein frühes Embryonalstadium (die Blastocyste) einer weißen Maus. Dieser Embryo wird dann in ein scheinchwangeres Mäuseweibchen implantiert. Bei den entstehenden Nachkommen handelt es sich um Chimären, weil die Mehrzahl der Zellen der injizierten Blastocyste normal sind. Die Chimären tragen ein weißes Fell mit graubraunen Flecken, die von den injizierten Stammzellen herrühren. Kreuzt man männliche Chimären mit einem weißen Weibchen, so haben alle vollständig graubraunen (Aguti-) Nachkommen das Transgen in ihrer Keimbahn eingebaut.

Regionen ist die DNA dicht gepackt, oft methyliert, von nichtacetylierten Histonen umgeben und wird folglich in der Regel nicht transkribiert.

Die Existenz solcher Positionseffekte konnte experimentell bestätigt werden. Dazu extrahierte man die transgene DNA aus einem transgenen Tier, bei dem das Transgen nicht exprimiert worden war. Mit dieser DNA erzeugte man dann eine weitere Linie transgener Tiere. Zeigen einige der neuen transgenen Tiere eine Expression des Transgens, so beweist das, dass das Gen selbst intakt ist. Die Grund dafür, dass das Gen in dem ursprünglichen Wirtstier nicht exprimiert wurde, war auf seine Position zurückzuführen (Abb. 15.6).

Die Position eines Transgens kann erhebliche Auswirkungen auf seine Expression haben.



15.6 Ausbleibende Expression aufgrund der Position eines Transgens

Um ein transgenes Tier zu erzeugen, baute man in dessen Genom DNA mit einem Transgen ein. In diesem Fall erfolgte der Einbau der DNA in eine Region aus Heterochromatin. Zwar erhielt man auf diese Weise transgene Tiere, aber das Transgen wurde nicht exprimiert. Daher isolierte man die DNA und erzeugte damit ein weiteres transgenes Tier. In diesem zweiten Tier wurde das Transgen exprimiert. Dies zeigt, dass es auch im ersten transgenen Tier intakt war. Aufgrund eines Einbaus an einer anderen Stelle muss ein Positionseffekt die Ursache dafür gewesen sein, dass es im ersten Fall nicht exprimiert wurde.

Konkurrierende Positionseffekte bei der Expression von Transgenen

Vermeiden lassen sich Positionseffekte durch einen zielgerichteten Einbau des Transgens an einer bestimmten Stelle (s. weiter unten). Als alternative Möglichkeit kann man auch geeignete regulatorische Elemente in das Transgenkonstrukt selbst einbauen.

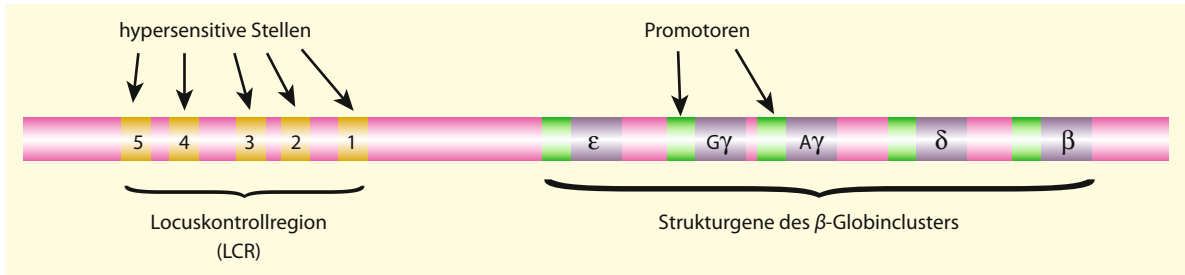
1. **Dominante Kontrollelemente.** Einige regulatorische Sequenzen kontrollieren in der Umgebung liegende Gene oder Gencluster auf dominante Weise. So bewirkt beispielsweise die vor dem Gencluster für β -Globin liegende **Locuskontrollregion (LCR)** (engl. *locus control region*) eine hohe Expression (Abb. 15.7). Dabei ist zu beachten, dass sich die LCR von den einzelnen Promotoren unterscheidet und sich auf mehrere zusammengegrupperte Gene auswirkt. LCR-Sequenzen sind dominant über sämtliche anderen in der Umgebung liegenden regulatorischen Sequenzen und bewirken somit eine positionsunabhängige Expression. Man hofft, durch den Einbau solcher LCR-Sequenzen vor einem Transgen, unabhängig von dessen Position auf dem Chromosom, ein hohes Maß an Expression erreichen zu können.
2. **Isolatorsequenzen** oder Grenzelemente. Diese Sequenzen blockieren die Aktivität anderer regulatorischer Elemente. Wird ein Gen von zwei Isolatorsequenzen flankiert, so ist es vor den Auswirkungen sämtlicher regulatorischer Elemente geschützt, die außerhalb der Isolatoren liegen (Abb. 15.8). Auf diese Weise kann man Transgene vor Positionseffekten schützen, indem man in das Transgenkonstrukt Isolatorsequenzen mit einbaut. Von Isolatoren flankierte Transgene bilden wahrscheinlich unabhängige DNA-Schleifen unter Ausschluss von Heterochromatin.
3. **Verwendung natürlicher Transgene.** Die meisten Transgene bestehen in Wirklichkeit aus cDNA und unterscheiden sich daher von der ursprünglichen Wildtypversion des Gens durch das Fehlen von Introns. Darüber hinaus unterstehen die meisten Transgene der Kontrolle viraler oder künstlicher Promotoren, die kürzer und besser handhabbar sind als die natürlichen Promotoren des Originalgens. Dennoch erweisen sich natürliche, in voller Länge eingebaute eukaryotische Gene häufig als

resistenter gegen Positionseffekte als die verkürzten gentechnisch hergestellten Versionen. Dies gilt insbesondere dann, wenn strangaufwärts und -abwärts liegende Kontrollelemente mit übertragen werden.

Komplette Gene von Tieren zu klonieren und zu manipulieren ist aufgrund der außerordentlichen Länge der DNA-Abschnitte nicht so einfach. Dennoch ist es möglich, solche Gene auf **künstliche Chromosomen** (s. Kap. 3) zu übertragen. In einigen Fällen ist es gelungen, mit Transgenen natürlicher Länge, die sich auf **künstlichen Hefechromosomen (YAC)**,

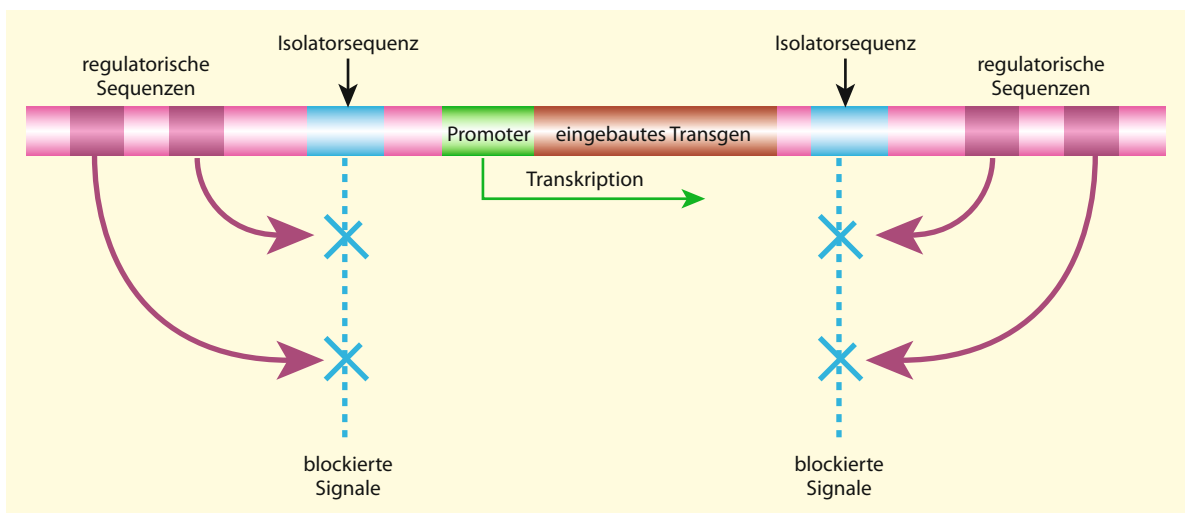
engl. *yeast artificial chromosomes*) befanden, transgene Tiere zu erzeugen. Mit Transgenen auf Basis von künstlichen Hefechromosomen hat man regulatorische Elemente erforscht, die sich über große Entfernungen auswirken. Außerdem hat man mit ihnen vollständige Gene für humanisierte monoklonale Antikörper auf Mäuse übertragen (s. Kap. 6).

Durch weitere gentechnische Eingriffe kann man Transgene vor Positionseffekten schützen. Dazu baut man in der Regel in der Nähe des Transgens ein entsprechendes regulatorisches Element ein.



15.7 Locuskontrollregion (LCR)

Die LCR des Genclusters für β-Globin erhöht die Expression aller fünf Gene des Clusters. Diese Kontrollregion befindet sich außerhalb der einzelnen Promotoren. Die LCR umfasst fünf DNase I-hypersensitive Stellen mit mehreren Consensussequenzen für die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren.



15.8 Schutz eines Gens durch Isolatorsequenzen

Flankierend zu einem Transgen eingebaute Isolatorsequenzen schützen das Transgen vor regulatorischen Elementen, die außerhalb der Isolatoren liegen.

Zielgerichteter Einbau des Transgens an einer bestimmten Stelle

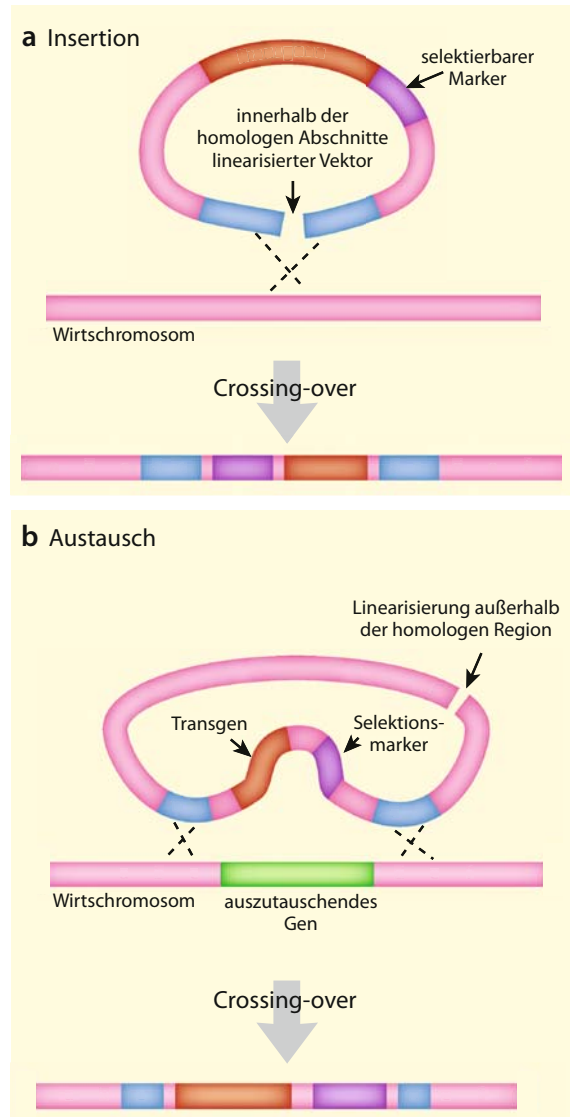
Der zielgerichtete Einbau eines Transgens an einer bestimmten Position im Wirtschromosom erfordert eine homologe Rekombination – im Gegensatz zum zufälligen Einbau, der gewöhnlich mit injizierter DNA erfolgt. Aus mehreren Gründen kann es wünschenswert sein, ein Transgen an einer ganz bestimmten Stelle einzubauen. Erstens wirkt sich die Position eines Transgens in einem Chromosom, wie gerade erläutert, häufig auf dessen Expression aus. Zweitens handelt es sich bei dem Transgen nicht zwangsläufig um ein neues Gen. Manchmal hat ein gentechnischer Eingriff auch zum Ziel, die Originalversion eines bestimmten Gens durch eine veränderte Version zu ersetzen. In diesem Fall ist es natürlich vorzuziehen, dass das Gen an derselben Stelle und unter derselben Regulation eingebaut wird wie das Gen, das ersetzt werden soll.

Die Methode des sogenannten **Gen-Targeting** beruht auf homologer Rekombination; für den zielgerichteten Einbau werden spezielle **Targeting-Vektoren** konstruiert. Die einzubauende DNA wird von Sequenzen flankiert, die homolog zu denen an der Zielposition sind. Targeting-Vektoren kann man unterteilen in solche, mit denen neue DNA eingebaut werden soll, und in solche, mit denen DNA ersetzt werden soll (Abb. 15.9). Oft werden die Targeting-Vektoren erst kurz vor der Transformation der DNA in die Zelle linearisiert, weil dies eine effizientere Rekombination begünstigt. Selektieren kann man den Einbau des erforderlichen DNA-Abschnitts durch Antibiotika oder eine andere Form der positiven Selektion.

Targeting-Vektoren bauen Transgene mittels homologer Rekombination an bestimmten Stellen des Wirtsgenoms ein.

Gezielte Kontrolle der Expression von Transgenen

In vielen Fällen wäre es hilfreich, die Expression eines Transgens zu kontrollieren. Für die industrielle Produktion eines Proteinprodukts ist es in der Regel vorzuziehen, dass das Transgen in großen Men-



15.9 Targeting-Vektoren beruhen auf homologer Rekombination

a Mithilfe von Targeting-Vektoren kann man ein Transgen an einer bestimmten Stelle in ein Wirtschromosom einbauen. Der Vektor enthält zu denen an der Insertionsstelle im Wirtschromosom (rosa) homologe Sequenzen (blau). Der linearisierte Vektor bewirkt ein einzelnes Crossing-over, wodurch das Transgen und der Selektionsmarker in das Wirtschromosom eingebaut werden. **b** Manche Targeting-Vektoren begünstigen den Austausch von Genen. Bei diesen Vektoren ist das Transgen von zwei separaten Regionen flankiert, die homolog zu Abschnitten des Wirtschromosoms sind. Wenn der linearisierte Vektor in den Zellkern gelangt, richten sich die homologen Regionen aneinander aus, und auf jeder Seite des Transgens erfolgt ein Crossing-over. Dadurch wird das Wirtsgen durch das Transgen und den Selektionsmarker ersetzt.

gen exprimiert wird. Das ist jedoch nicht immer der Fall – einige Proteine sind in hohen Mengen toxisch; daher muss ihre Genexpression beim Erzeugen transgener Tiere niedrig gehalten werden. Werden die Transgene jedoch für Funktionsanalysen verwendet, so ist es gewiss von Vorteil, wenn man die Genexpression nach Bedarf an- oder abschalten kann. Besonders wichtig ist dies bei solchen Genen, die normalerweise nur in bestimmten Zelllinien oder Entwicklungsstadien exprimiert werden. Zur Kontrolle von Transgenen stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung.

Induzierbare endogene Promotoren

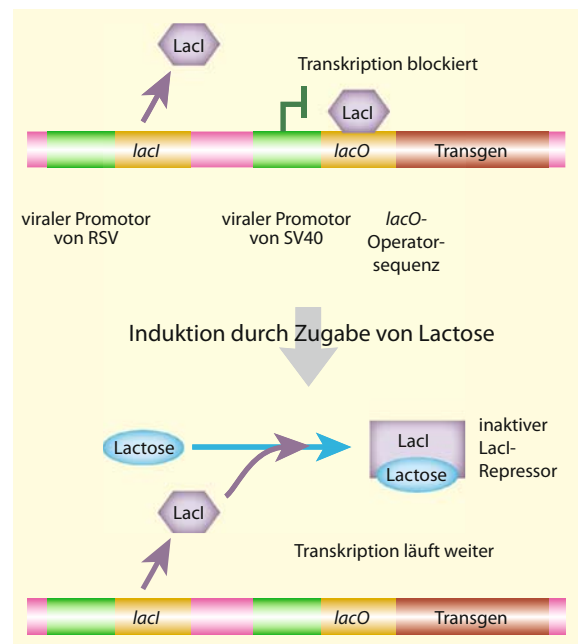
Bei den ersten transgenen Konstrukten verwendete man häufig natürliche Promotoren des Wirtstieres (also endogene Promotoren), die auf bestimmte Reize reagieren. So unterstellte man beispielsweise das Gen für das Wachstumshormon der Ratte beim Einbau in Mäuse der Kontrolle des Metallothionein-Promotors der Maus. Dieser Promotor wird durch Schwermetalle wie Blei, Cadmium oder Zink induziert. In der Praxis verwendet man zur Induktion das am wenigsten toxische dieser Metalle, Zink, aber selbst dann ergeben sich Probleme mit der Toxizität, wenn eine kontinuierliche Induktion über einen längeren Zeitraum erforderlich ist.

Der Hitzeschockpromotor des *HSP70*-Gens von *Drosophila* ist ein weiteres Beispiel für einen natürlichen Promotor, der zur einer erhöhten Expression von Transgenen verwendet wird. In diesem Fall ist der Promotor bei Raumtemperatur inaktiv; der induzierende Reiz ist eine Temperaturerhöhung auf 37°C.

Solche einfachen induzierbaren Promotoren haben einige Nachteile. Erstens erfolgt häufig selbst ohne den induzierenden Reiz eine signifikante Expression, und die Schwelle für die Induktion ist oft gering. Zweitens treten häufig toxische Nebenwirkungen auf. Diese sind möglicherweise direkt auf den induzierenden Reiz zurückzuführen (z.B. Zink, hohe Temperaturen) oder werden durch die Induktion anderer natürlicher Gene verursacht, die auf denselben Reiz reagieren. Drittens kann es auch vorkommen, dass der induzierende Reiz nur langsam aufgenommen wird und/oder nur in manche Gewebe des Organismus vordringt. Einige dieser Probleme lassen sich vermeiden, indem man fremde oder künstlich konstruierte Promotoren verwendet.

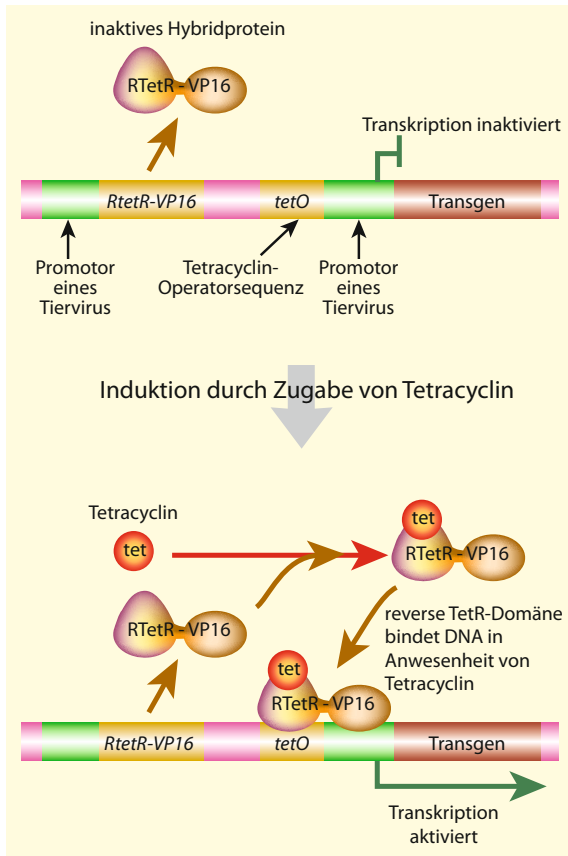
Rekombinante Promotorsysteme

Zur Kontrolle von Transgenen in Tieren und Pflanzen hat man bakterielle Repressoren wie den **LacI-Repressor** und **TetR-Repressor** verwendet. Zur Verwendung in transgenen Tieren muss das *lac*-System, wie in Abbildung 15.10 veranschaulicht, modifiziert werden. Codiert wird der LacI-Repressor durch das *lacI*-Gen. Dieses wird durch Hinzufügen eines Promotors des Rous-Sarkom-Virus (RSV) modifiziert, was die Expression in tierischen Zellen gewährleistet. Ein weiterer Promotor eines tierischen Virus, von SV40 (Simian Virus 40), kontrolliert das Transgen. In diesen Promotor wird zusätzlich eine *lacO*-Operatorsequenz eingebaut. Der LacI-Repressor bindet an die Operatorsequenz und verhindert die Expression des Transgens über den SV40-Promotor (s. Abb. 15.10). Bei Zugabe von IPTG bindet das LacI-Protein an IPTG und wird von der Operatorsequenz abgelöst. Somit wird durch IPTG die Expression des Transgens induziert.



15.10 LacI-Kontrolle eines Transgens

Der Promotor eines Rous-Sarkom-Virus (RSV) aktiviert die Transkription des *lacI*-Gens. Bei Expression des Konstrukts in einem transgenen Tier wird LacI-Protein produziert. Der LacI-Repressor bindet an die Operatorsequenz strangaufwärts des Transgens und blockiert dessen Expression. Gibt man den Induktor IPTG hinzu, so bindet er an LacI, das sich daraufhin von der Operatorsequenz ablöst. Nun wird die Transkription des Transgens durch den SV40-Promotor aktiviert.

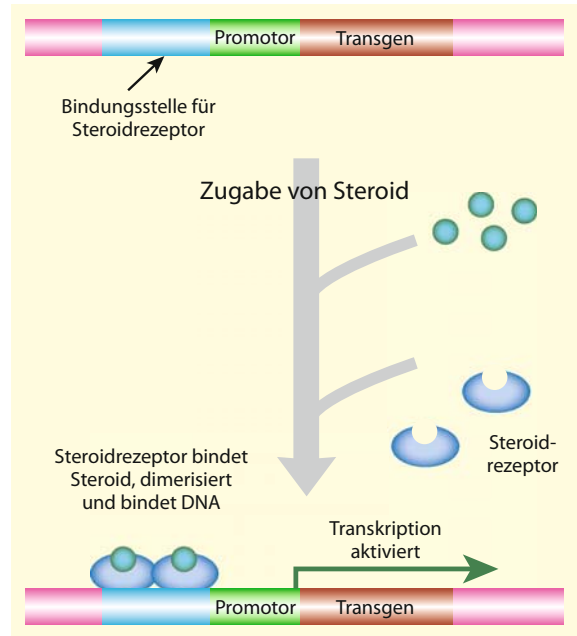


15.12 Reverses TetR-VP16-Transaktivatorsystem

Das reverse TetR-VP16-Hybridprotein bindet nur in Anwesenheit von Tetracyclin an *tetO*. Im Gegensatz zum vorherigen Fall (s. Abb. 15.11) wird das Transgen daher nur bei Vorhandensein von Tetracyclin exprimiert.

Da sich Steroide auch innerhalb weniger Stunden eliminieren lassen, eignen sie sich ausgezeichnet als Moleküle zur Induktion von Transgenen.

Hierbei stellt sich das Problem, die Induktion anderer Gene zu vermeiden, die auf Steroide reagieren. Dies gelingt unter anderem durch die Verwendung von Steroiden, die nicht natürlich im Wirtstier vorkommen. So kann man beispielsweise das Steroid **Ecdyson** aus Insekten in transgenen Säugetieren verwenden und umgekehrt **Glucocorticoidhormone** von Säugetieren bei transgenen Insekten oder Pflanzen. Allerdings muss man das Bindungsprotein für das gewählte Hormon ebenfalls zur Verfügung stellen. Eine Erkennungssequenz für dieses Protein wird strangaufwärts des Zieltransgens platziert (Abb. 15.13). Das führt dazu, dass bei Zugabe des Steroids das Transgen induziert wird.



15.13 Aktivierung von Transgenen durch Steroidhormone

Bei manchen transgenen Tieren steht das Transgen unter der Kontrolle eines Steroid-regulierten Promotors. Wird das Tier mit Steroiden behandelt, diffundiert das Steroid durch die Zellmembran und bindet an seinen Rezeptor im Cytoplasma. Der Steroid-Rezeptor-Komplex dringt dann in den Zellkern ein, bindet dort an den Transgen-Promotor und schaltet die Transkription des Transgens an.

Um bessere Reaktionen zu erzielen, hat man veränderte und/oder hybride **Steroidrezeptoren** verwendet. Ein kuriose Beispiel ist die Verwendung einer mutierten Version des Progesteronrezeptors von Säugetieren. Die mutierte Version kann kein Progesteron mehr binden, bindet jedoch nach wie vor den Antagonisten **RU486** (den aktiven Bestandteil der Abtreibungspille). Wenn man RU486 als Induktor verwendet, ist die benötigte Konzentration 100-mal geringer als diejenige, die für eine Abtreibung erforderlich ist. Beim Einsatz dieses Rezeptors kommt es nicht zu Wechselwirkungen mit endogenen Steroiden, und eine Behandlung mit RU486 löst bei den transgenen Tieren auch keinen Abort aus.

Transgene können durch verschiedene Kontrollsysteme künstlich reguliert werden. Häufig werden modifizierte Versionen des bakteriellen *lac*- und *tet*-Regulators verwendet.

Regulation durch sequenzspezifische Rekombination mit Cre oder Flp

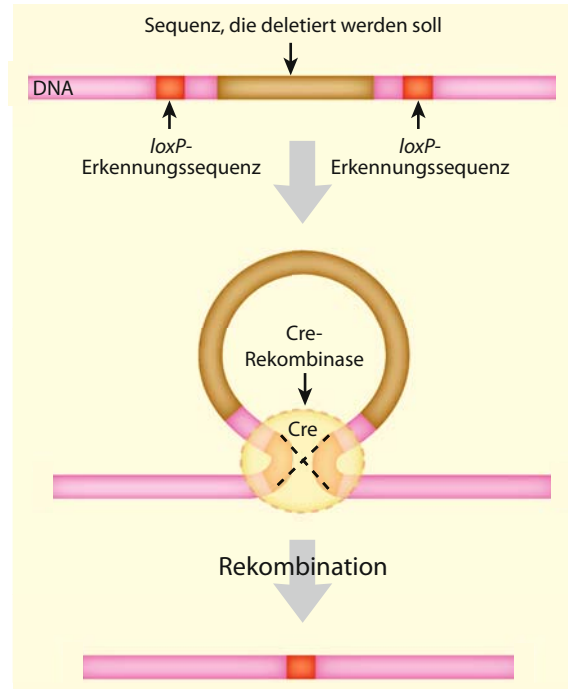
Als weitere Möglichkeit zur Kontrolle der Expression eines Transgens bietet sich die sequenzspezifische Rekombination an. Bei dieser Methode werden DNA-Abschnitte physikalisch entfernt oder invertiert, um eine Aktivierung des Gens zu erreichen. Diese Manipulationen an der DNA erfolgen nach dem erfolgreichen Einbau der DNA mit dem Transgen (und den zugehörigen Sequenzen) in die Keimbahnchromosomen eines Wirtstieres.

Für eine sequenzspezifische Rekombination müssen bestimmte kurze Sequenzen von DNA-bindenden Proteinen erkannt werden. Daraufhin erfolgt eine Rekombination zwischen zwei der Erkennungssequenzen. Bei einigen Systemen zur sequenzspezifischen Rekombination sind für Erkennung und Crossing-over mehrere Proteine erforderlich. Bei anderen muss nur ein einzelnes Protein an die beiden Erkennungssequenzen binden und diese rekombinieren. Für gentechnische Eingriffe eignen sich diese natürlich weitaus besser.

Zwei solche **Rekombinasesysteme** wurden häufig verwendet: die **Cre-Rekombinase** aus dem Bakterienvirus P1 und die **Flp-Rekombinase (Flippase)** aus dem 2- μ m-Plasmid von Hefe. Sowohl Cre als auch Flp erkennen Sequenzen aus 34 Basenpaaren (die unter den Bezeichnungen **loxP** beziehungsweise **FRT** bekannt sind). Diese bestehen aus je 13 Basenpaaren invertierter Sequenzwiederholungen, die einen zentralen Kern aus 8 Basenpaaren flankieren.

Die Verwendung des Cre/loxP-Systems bei Pflanzen, zur Deletion unerwünschter DNA-Segmente nach Einbau transgener DNA, wurde bereits in Kapitel 14 beschrieben. Ähnliche Manipulationen kann man mithilfe von Cre/loxP oder Flp/FRT auch bei Tieren durchführen. Um unerwünschte DNA-Abschnitte gezielt entfernen zu können, sollten diese von loxP- oder FRT-Sequenzen flankiert werden (Abb. 15.14). (Von zwei loxP-Sequenzen flankierte Abschnitte bezeichnet man bisweilen als „gefloxt“.) Diese Methode kann zu verschiedenen Zwecken eingesetzt werden; einige davon sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Entfernen von Selektionsmarkern. Nach dem erfolgreichen Einbau der transgenen DNA werden das zur Selektion dienende Antibiotikaresistenzgen und/oder das zum Screening dienende Reportergen nicht mehr benötigt. Werden sie von loxP-



15.14 Sequenzspezifische Deletionen bei transgenen Tieren

Zunächst müssen flankierend zu der Sequenz, die deletiert werden soll, zwei loxP-Sequenzen in die DNA eingebaut werden. Wird Cre-Rekombinase aktiviert, rekombiniert sie die beiden loxP-Sequenzen und eliminiert den dazwischen liegenden DNA-Abschnitt.

- oder FRT-Sequenzen umschlossen, so kann man sie entfernen, sodass der transgene Organismus nur noch das eigentliche Transgen enthält (plus eine einzelne Kopie der loxP- oder FRT-Sequenz).
2. Aktivierung des Transgens. Hierbei wird in das originale Transgenkonstrukt zwischen dem Promotor und dem Transgen eine blockierende Sequenz eingebaut. Diese ist flankiert von den loxP- oder FRT-Sequenzen. Nach Einbau der DNA wird die blockierende Sequenz durch Cre- oder Flp-Rekombinase entfernt und das Transgen so aktiviert.
3. Modifikation von Chromosomen *in vivo*. In großem Maßstab kann man Deletionen oder Neuordnungen eukaryotischer Chromosomen *in vivo* mithilfe des Cre/loxP-Systems erzeugen. Dazu werden durch zwei DNA-Insertionen an getrennten, spezifischen Stellen zwei loxP-Sequenzen eingebaut. Anschließend wird die Cre-Rekombinase aktiviert und die Deletionen erzeugt.

4. Erzeugen konditioneller Knockout-Mutanten. Man kann Transgenkonstrukte so erzeugen, dass ein bestimmtes Gen *in vivo* deletiert werden kann. Dazu baut man in der Regel in die Introns, die ein essenzielles Exon des Zielgens flankieren, zwei *loxP*-Sequenzen ein. Durch Rekombination wird das Exon entfernt und das Zielgen inaktiviert. Dadurch kann man Gene erforschen, deren Knockout-Mutationen im embryonalen Stadium letal sind. Man lässt das Tier zunächst zum adulten Tier heranwachsen, bevor die Rekombinase aktiviert und so der Knockout erzeugt wird.
2. Das Rekombinasegen kann selbst Teil des transgenen Konstrukts sein und durch irgendeinen externen Reiz induziert werden.
3. Man verwendet zwei getrennte Linien transgener Organismen. Das Transgen und die Erkennungssequenzen sind in einer Wirtslinie transgener Organismen vorhanden, eine zweite Linie exprimiert die Rekombinase (Abb. 15.15). Wenn diese beiden Linien miteinander verpaart werden, treten bei den Nachkommen die Deletionen auf.

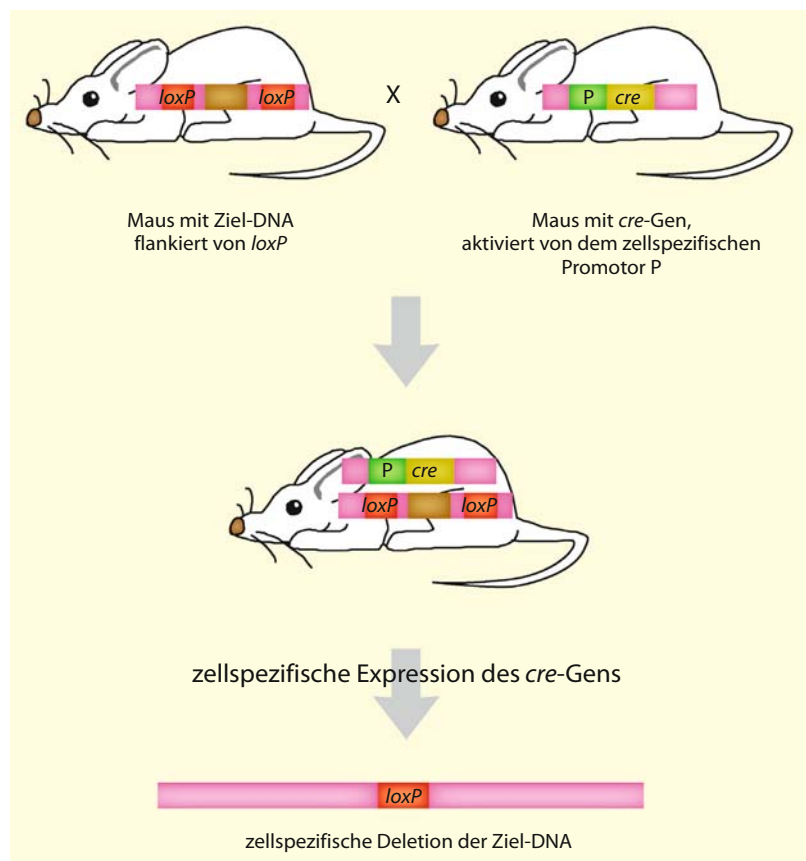
Bei Verwendung dieser Rekombinasesysteme sind die Erkennungssequenzen in den Transgenkonstrukten enthalten. Später wird die Rekombinase selbst durch eine der folgenden drei Methoden bereitgestellt:

1. Das Gen für Rekombinase kann auf einem Plasmid in ein Tier transformiert werden. Die Rekombinase wird nur vorübergehend exprimiert – voraussetzend, dass das Plasmid nicht eingebaut wird oder langfristig überdauert.

Diese Methode kann eine Menge Arbeit ersparen. Statt für jedes Gen unter jeder Bedingung ein separates Transgenkonstrukt zu schaffen, erzeugt man einfach zwei Linien transgener Tiere, gewöhnlich Mäuse, und kreuzt diese dann. So lassen sich zahlreiche Gene und Umweltbedingungen erforschen. Bei den Vertretern der einen Mäuselinie untersteht das *cre*-Gen der Kontrolle verschiedener Promotoren, die spezifisch für bestimmte Gewebe sind oder von unterschiedlichen Reizen induziert werden. Bei der zweiten Mäuselinie werden verschiedene Ziel-

15.15 Das Cre/LoxP-System mit zwei Mäusen

Die eine Maus enthält die Ziel-DNA, die deletiert werden soll, flankiert von zwei *loxP*-Sequenzen. Eine zweite Maus enthält das Gen für Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen oder induzierbaren Promotors. Wenn sich diese beiden Mäuse paaren, werden einige der Nachkommen eine Kopie beider Genkonstrukte erhalten. Wird die Synthese des Cre-Proteins induziert, dann steuert dieses die Deletion der Ziel-DNA.



gene von *loxP*-Sequenzen flankiert. Indem man die entsprechenden Stämme miteinander kreuzt, kann man die Funktion jedes einzelnen Zielgens unter allen verfügbaren Bedingungen erforschen.

Die Expression von Transgenen kann durch sequenzspezifische Rekombination kontrolliert werden. Neuordnungen der transgenen DNA, die Transgene an- oder abschaltet, werden von der Cre- oder der Flp-Rekombinase aktiviert.

Transgene Insekten

Mehrere Insektenarten können inzwischen genetisch modifiziert werden. Da die Taufliege *Drosophila* schon sehr lange auf molekularer Ebene erforscht wird, überrascht es nicht, dass es Methoden zum Einbau von neuem genetischen Material in diese Fliegen gibt.

P-Elemente sind in *Drosophila* und anderen Insekten vorkommende Transposons. Sie bewirken das Phänomen der sogenannten **Hybriddysgenese**. Fliegen mit einem P-Element zeichnen sich durch eine sehr geringe Transpositionshäufigkeit aus, weil das vorhandene P-Element die Synthese eines Repressorproteins codiert. Kreuzt man Männchen, die das P-Element tragen, mit Weibchen ohne das P-Element, so ist die Transpositionsfrequenz in der befruchteten Eizelle für kurze Zeit sehr hoch, da kein Repressor vorhanden ist. Durch den zufälligen Einbau der P-Elemente kommt es dann zu einer hohen Mutationsrate, wodurch sich der Anteil lebensfähiger Nachkommen verringert; dies bezeichnet man als Hybriddysgenese.

P-Elemente sind von perfekten *inverted repeats* aus 31 Basenpaaren flankiert. Jede zwischen diesen invertierten Sequenzwiederholungen liegende DNA-Sequenz wird transponiert. Daher kann man durch den gentechnischen Einbau von P-Elementen jede beliebige DNA-Sequenz in einen Stamm Taufliegen oder irgendwelche anderen dafür empfänglichen Insekten einschleusen.

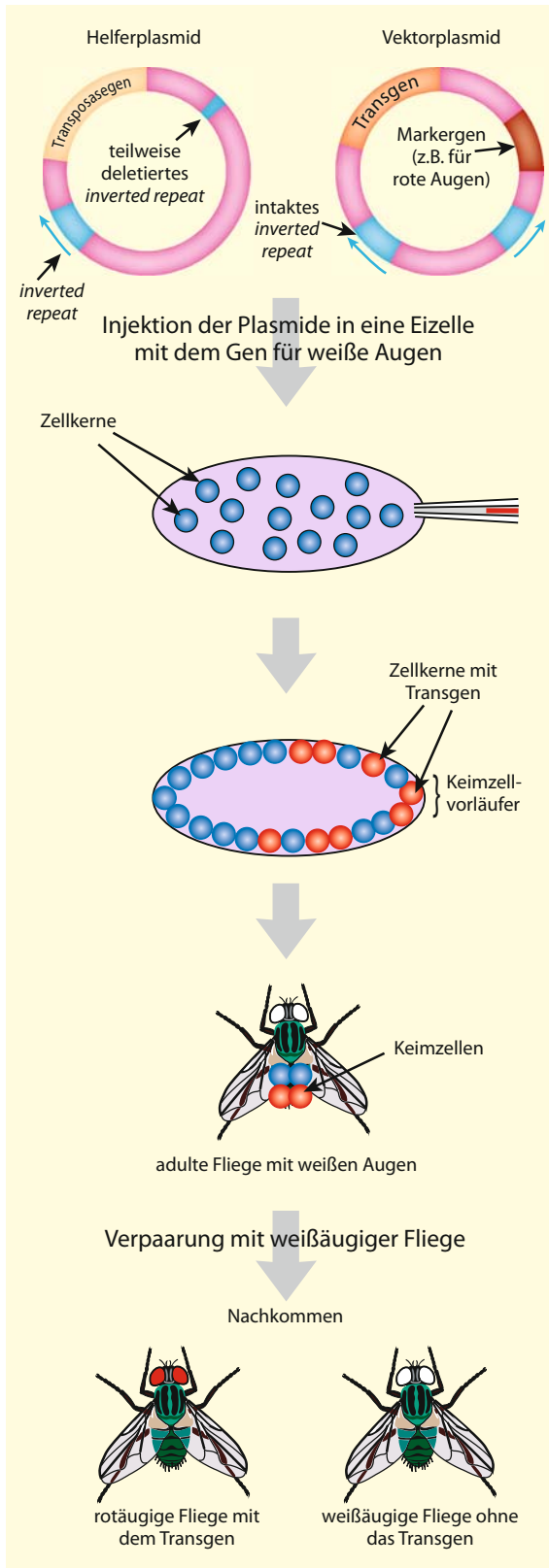
Durch Mikroinjektion kann man die DNA in Embryonen von P-negativen *Drosophila*-Stämmen einführen. Bei Taufliegen teilt sich der diploide Zellkern, der bei der Verschmelzung der Kerne von Spermien- und Eizelle entsteht, mehrere Male, ohne dass dabei eine Zellteilung erfolgt. Dadurch entsteht eine Riesenzelle mit vielen Kernen, die man als **Syncytium** bezeichnet. In diesem Stadium wird normalerweise die Mikroinjektion durchgeführt. Die dabei injizierte DNA wird in der Regel zumindest in einige Zellkerne eingebaut,

aus denen später die Zellen der Keimbahn entstehen (Abb. 15.16). Diese Zellkerne sind am hinteren (*posterioren*) Ende der befruchteten Eizelle (Zygote) gruppiert und wandern von dort zur äußeren Membran, wo sich um jeden Kern eine Teilungsfurche bildet. Diese Furchen dehnen sich dann aus, und um jeden Zellkern bildet sich eine einzelne Zelle. Der zentrale Teil der Zygote bleibt ungeteilt und dient als Dotter zur Nährstoffversorgung der sich entwickelnden Larve.

Das P-Element wird normalerweise auf einem bakteriellen Plasmid eingeschleust, das in einem bakteriellen Wirt konstruiert wurde. Nun kommt es zur Transposition des P-Elements in das *Drosophila*-Chromosom, die Plasmidsequenzen bleiben zurück. In der Praxis verwendet man häufig zwei P-Elemente. Eines, der Helfer, liefert die Transposase, ist selbst aber aufgrund defekter *inverted repeats* unbeweglich (s. Abb. 15.16). Das andere P-Element, der Vektor, trägt das gewünschte Transgen und ein intaktes *reverted repeat* aus 31 Basenpaaren; das Transposasegen fehlt ihm jedoch. Die Transposition des Vektors erfolgt nur, wenn vom Helferplasmid Transposase synthetisiert wird. Wurde der P-Element-Vektor erst einmal an einer bestimmten Stelle in das Insektenchromosom eingebaut, ist er in künftigen Zellgenerationen nicht mehr mobil, weil er keine eigene Transposase besitzt. Im Idealfall wird er stabil vererbt.

Ob das P-Element vorhanden ist, lässt sich mittels geeigneter Markergene überprüfen. Zu den bei Fliegen verwendeten Selektionsmarkern gehören *neo* (Neomycinresistenz) und *adh* (Alkohol-Dehydrogenase). Als Alternative können auch Gene für die Augenfarbe verwendet werden, um die Anwesenheit eines P-Element-Vektors nachzuweisen. Die Augenfarbe kann nicht positiv selektiert werden, also achtet man auf Veränderungen der Augenfarbe. So kann man beispielsweise als Wirte Fliegen mit defektem **rosy-Gen** verwenden. Diese Fliegen haben braune Augen, weil ihnen Xanthin-Dehydrogenase fehlt, die an der Synthese des roten Augenfarbstoffs beteiligt ist. Fügt man dem P-Element-Vektor eine Wildtypkopie der *rosy*-Gene hinzu, so wird die rote Augenfarbe wiederhergestellt. Haben die Nachkommen einer transgenen *rosy*^{-/-}-Fliege dann rote Augen, bestätigt dies, dass das Transgen in die Keimbahn eingebaut wurde und alle Zellen dieser Nachkommen das Transgen enthalten.

Als P-Elemente bezeichnete Transposons sind bei *Drosophila* und anderen Insekten weit verbreitet. Man hat sie für den Einbau von transgener DNA in Insekten verwendet.



15.16 Einbau eines P-Elements in *Drosophila*

Zum Einbau von Transgenen in *Drosophila* werden zwei verschiedene Plasmide verwendet. Das Helferplasmid liefert die Transposase. Es trägt ein nicht mobiles P-Element, bei dem eines der *inverted repeats* deletiert wurde, aber ein funktionelles Transposasegen. Das zweite Plasmid trägt das Transgen plus einen Marker (ein Gen für rote Augen), flankiert von den *inverted repeats* des P-Elements. Beide Vektoren werden in das hintere Ende der Eizelle injiziert, das 2000 bis 4000 Zellkerne innerhalb einer einzigen Membran enthält. Die Expression des Transposasegens bewirkt eine zufällige Transposition des Transgens (einschließlich des Markers) in unterschiedliche Chromosomen verschiedener Zellkerne. Es ist zu hoffen, dass einige Insertionen auch in den Zellkernen der Keimzellen erfolgen. Die aus dem befruchteten Ei schlüpfende Larve lässt man dann ihre Entwicklung zu adulten Fliegen (in diesem Fall mit weißen Augen) durchlaufen. Diese Fliege wird dann mit einer weiteren Fliege mit weißen Augen verpaart. Bei erfolgreichem Einbau des Transgens in die Keimbahn werden einige der Nachkommen das Marker-gen exprimieren und rote Augen haben.

Genetisch modifizierte Stechmücken

Aids (erworbenes Immundefizienzsyndrom), Tuberkulose und Malaria sind die drei Krankheiten, denen die meisten Menschen zum Opfer fallen. Pro Jahr infizieren sich rund 300 bis 500 Millionen Menschen mit Malaria, und etwa zwei Millionen sterben daran, vor allem Kinder in Afrika. Der Erreger, der Parasit *Plasmodium*, wird ebenso wie viele andere schlimme Krankheiten wie Gelbfieber, Denguefieber und Filarien durch Stechmücken übertragen. Derzeit breitet sich Malaria immer weiter aus, und es tauchen immer mehr gegen Insektizide wie DDT resistente Stechmücken auf. Das 260 Mb große Genom der Stechmücke *Anopheles gambiae*, die Malaria überträgt, wurde vollständig sequenziert, und es liegen verschiedene genetische Marker vor. Noch nicht ganz abgeschlossen ist die Sequenzierung des etwa dreimal größeren Genoms (800 Mb) von *Aedes aegypti*, dem Überträger von Gelbfieber.

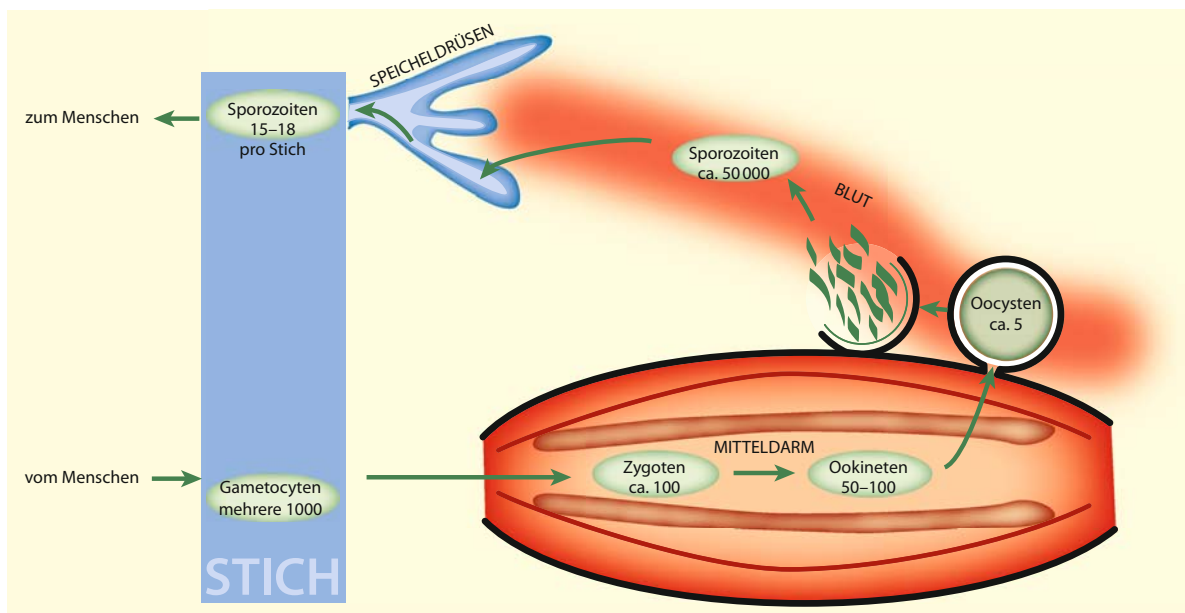
Wie bei den Fliegen kann man auch bei Stechmücken DNA in die Zellen der Keimbahn einbauen. Zur Insertion von DNA in die Genome von Stechmücken hat man mehrere Transposons verwendet und ging dabei ähnlich vor wie bei der zuvor für *Drosophila* beschriebenen Methode mit den P-Elementen. Am häufigsten verwendet werden das *piggyBac*-Transpo-

son des Eulenfalters *Trichoplusia ni* und das **Minos**-Transposon der Taufliege *Drosophila hydei*. Als genetische Marker dienten Gene für die Augenfarbe und grün fluoreszierendes Protein (GFP). Die Expression der Transgene erfolgt gewöhnlich mit *Drosophila*-Promotoren, weil diese meist auch in anderen Insekten funktionieren.

Als mögliche Bekämpfungsmethode für Krankheiten, die von Stechmücken übertragen werden, bietet sich an, genetisch modifizierte Stechmücken zu erzeugen, die resistent gegen eine Besiedlung mit dem Krankheitserreger sind. Diese Stechmücken könnte man dann in die Natur entlassen, damit sie nach und nach die Population der krankheitsübertragenden Stechmücken ersetzen. Man hat schon mehrere Versuche unternommen, Stechmücken zu erzeugen, die keine Malaria mehr übertragen oder zumindest weniger Malariaparasiten in sich tragen. Bislang wurden diese Versuche aber nur mit Malariaformen durchgeführt, die Vögel oder Mäuse befallen. Man erhofft sich, mit ähnlichen Methoden auch die für den Menschen gefährliche Form der Malaria und ihren Überträger, die *Anopheles*-Mücke, bekämpfen zu können.

Nach Aufnahme infizierten Blutes eines Menschen oder Tieres, greift das Immunsystem der Stechmücke die aufgenommenen Malariaparasiten an und tötet einen beträchtlichen Teil davon ab (Abb. 15.17). Daher versucht man, Stechmücken zu erzeugen, bei denen die Expression von Proteinen ihres eigenen Immunsystems wie **Defensin A** erhöht ist. Auch Proteine anderer Arten wurden schon im Mitteldarm der Stechmücken exprimiert, um eine Übertragung zu verhindern. Bei transgenen Stechmücken, die das Bienengift **Phospholipase** mittels eines mitteldarmspezifischen Promotors exprimieren, werden 80–90 % der aufgenommenen Malariaparasiten abgetötet.

Eine weitere Strategie nutzt gentechnisch veränderte menschliche Antikörper. So hat man beispielsweise künstliche Gene für **Einzelketten-Antikörper** oder **Einzelketten-Fv-Fragmente** (scFv-Fragmente; s. Kap. 6) gegen das **Circumsporozoiten-Protein** des Malariaerregers konstruiert. (Der Sporozoit ist das infektiöse Stadium des Parasiten, das von der Stechmücke auf ein Säugetier übertragen wird – s. Abb. 15.17) Durch Expression des Antikörpers in den Speicheldrüsen der Stechmücke konnte die



15.17 Entwicklung von *Plasmodium* in der *Anopheles*-Mücke

Das Blut eines mit Malaria infizierten Menschen enthält Tausende von *Plasmodium*-Gametocyten, die eine *Anopheles*-Mücke aufnimmt, wenn sie sticht (unten). Mit der Aufnahme des Blutes gelangen diese in den Mitteldarm der Stechmücke, wo daraus Hunderte von Zygoten entstehen. Etwa 50 bis 100 davon verwandeln sich in bewegliche Ookineten, die dann in die Hämolymphe oder ins Blut wandern. Dort entstehen daraus etwa fünf Oocysten. Jede Oocyste setzt ungefähr 50 000 Sporozoiten frei, die in die Speicheldrüse der Stechmücke wandern. Sticht diese Mücke wieder einen Menschen, gelangen dabei nur etwa 15 bis 18 Sporozoiten in den Blutkreislauf. Die Lebensstadien von *Plasmodium* sind grün dargestellt, die Strukturen der Stechmücke mit Großbuchstaben beschriftet.

Zahl der Malaria-Sporozoitien beträchtlich reduziert werden.

Wenn es gelänge, Stechmücken so zu modifizieren, dass sie keine Malaria mehr übertragen, ergäbe sich ein weiteres Problem: die wildlebende Stechm ckenpopulation durch die modifizierte zu ersetzen. Das könnte man beispielsweise mit einem genetischen Suizidsystem aus den beiden Genen A und B erreichen, die zum  berleben beide gemeinsam vererbt werden müssen. Ein solches System ähnelt dem, das für den programmierten Zelltod bei Bakterien verantwortlich ist (s. Kap. 20). Man könnte dann Männchen mit je zwei Kopien von A und B freisetzen.

Insekten, die A und B gemeinsam erben,  berleben, während alle, die nur jeweils eines der beiden erben, sterben. Hybriden zwischen den gentechnisch modifizierten Männchen und wilden Weibchen werden  berleben, weil sie jeweils ein A und ein B erben. Paaren sich diese Hybriden jedoch in der nächsten Generation wiederum mit Wildtypstechm cken, so werden einige der Nachkommen jeweils nur Gen A oder Gen B erben, aber nicht beide, und daher sterben. Dadurch entst nde ein Selektionsdruck, der die Gene A und B in der Population begünstigt, weil die Nachkommen von Wildtypm cken häufiger sterben als die von genetisch modifizierten oder Hybridm cken. Mit den Suizidgenen könnte man Gene verbinden, welche die Malariaparasiten abtöten oder die Stechmücken anfällig gegen Insektizide machen. Diese würden sich dann mit diesen ebenfalls in der Population ausbreiten. Computermodellen zufolge würde schon eine Modifikation von nur 3 % der Population ausreichen, damit sich die Gene ausbreiten.

Man versucht, *Anopheles*-Mücken so zu modifizieren, dass sie keine Malaria mehr übertragen. Ziel ist es, die Wildtyppopulationen durch solche zu ersetzen, die keine Überträger sind.

zurück. Damals transplantierte man Zellkerne aus frühen Embryonalstadien eines Frosches in Eizellen, die man zuvor entkernt hatte. Aus einigen dieser Versuche gingen normale Embryonen hervor. Die somatischen Zellen von Tieren differenzieren sich irgendwann und werden so schließlich irreversibel auf eine spezielle Funktion festgelegt. Dennoch behalten ihre Zellkerne das vollständige Genom. (Nur in wenigen Ausnahmen wie den roten Blutkörperchen gehen die Zellkerne verloren.) Unter bestimmten Umständen kann die cytoplasmatische Umgebung in der Eizelle Zellkerne aus somatischen Zellen umprogrammieren. Je früher das Entwicklungsstadium der Zellkerne, desto leichter sind sie umzuprogrammieren.

Mittels Kerntransplantation kann man mehrere identische **Klontiere** erzeugen. Dazu werden mehrere Zellkerne desselben Spenders in entkernte Eizellen transplantiert. Seit den 1980er-Jahren ist ein solcher Transfer von Kernen aus frühen Embryonalstadien (Morula- und Blastocystenstadium) bei mehreren Säugetierarten erfolgreich gelungen. Bei Verschmelzung einer somatischen Zelle mit einer entkernten Eizelle wird der Spenderzellkern in ein völlig undifferenziertes Cytoplasma übertragen. Durch einen kurzen elektrischen Stromimpuls werden die beiden Zellmembranen zu einem Embryo verschmolzen. Im Jahr 1995 gelang die erfolgreiche Transplantation von Zellkernen aus kultivierten embryonalen Zellen eines Schafes. Durch diese Technik kamen am Roslin Institute in Edinburgh, Schottland, die beiden Lämmer Megan und Morag zur Welt. Ein Jahr darauf erzeugte dieselbe Forschungsgruppe durch Kerntransplantation aus einer adulten Zelllinie – aus der Epithelschicht der Milchdrüsen – das Schaf Dolly. Dolly war somit das erste Säugetier, das unter Verwendung eines Zellkerns aus ausdifferenzierten Zellen kloniert wurde.

Säugetiere kann man durch Kerntransplantation klonen. Dabei wird der Zellkern einer somatischen Zelle in eine zuvor entkernte Eizelle transplantiert.

Klonen von Tieren durch Kerntransplantation

Das im Jahr 1996 erzeugte Klonschaf Dolly sorgte in den Medien zwar für einen riesigen Wirbel, war aus wissenschaftlicher Sicht jedoch nur ein relativ kleiner Schritt in einer sich entwickelnden Technologie. Das Klonen von Tieren beruht auf der Technik der **Kerntransplantation**. Diese geht sogar auf das Jahr 1952

Das Klonschaf Dolly

Die Zellen eines frühen Embryos sind **totipotent**, d.h. sie besitzen die Fähigkeit, sich zu teilen und zu jedem beliebigen K rperzelltyp zu differenzieren (zu Leberzellen, Milzzellen, Gehirnzellen etc.). Später geht den Zellen diese Fähigkeit verloren. Dann sind sie darauf

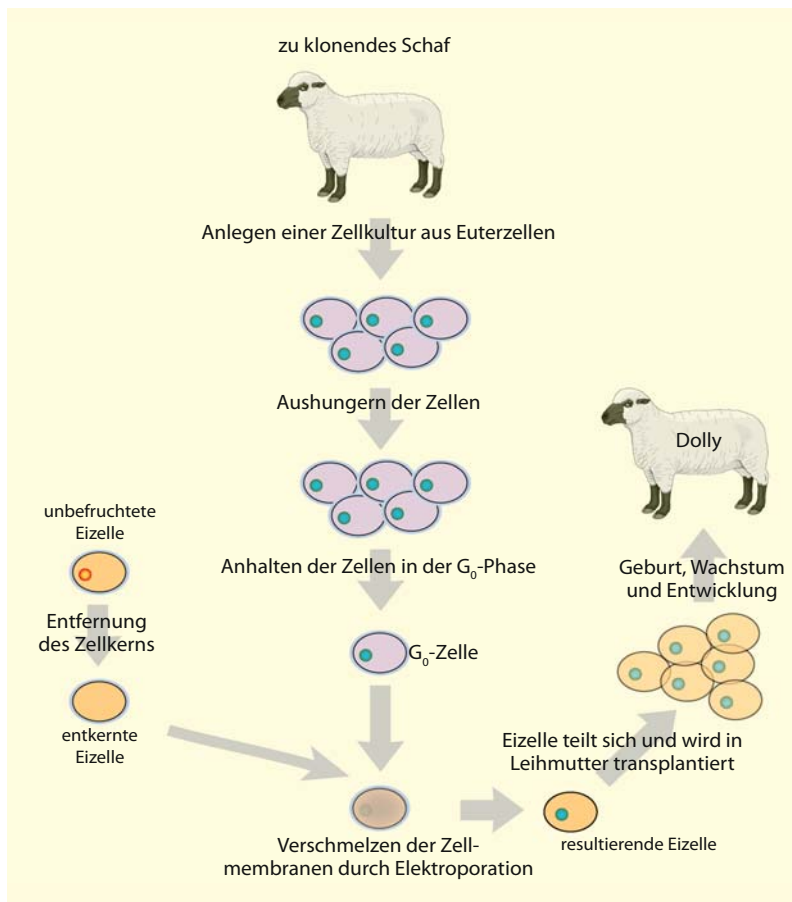
beschränkt, ein bestimmtes Gewebe, etwa des Nervensystems oder des Verdauungstraktes, zu bilden. Die meisten Zellen eines adulten Tieres können sich entweder nicht mehr teilen oder nur noch einen ganz bestimmten spezialisierten Zelltyp hervorbringen. Während der Entwicklung werden verschiedene Gene in unterschiedlichen Geweben exprimiert, andere abgeschaltet. So enthalten zwar fast alle adulten Zellen ein vollständiges Genom, sind jedoch nicht mehr imstande, sich zu neuen Individuen zu entwickeln.

Das Klonieren des Schafes Dolly erbrachte den Beweis, dass man die Uhr einer adulten Zelle wieder auf Null stellen und die Entwicklung von Neuem starten kann. Im Fall von Dolly bestand der Trick darin, dass man kultivierte Euterzellen des Spendertieres verhungern ließ, sodass sowohl die Zelle als auch die DNA ihre Teilung einstellen (d.h. die Zellen gingen in die **G₀-Phase** des Zellzyklus über – s. Kap. 4). Was genau mit der DNA passiert, wenn man die Zelle aushungern lässt, ist nicht bekannt. Wahrscheinlich kommt es jedoch zu einer Modifikation, etwa ei-

ner Demethylierung; dadurch wird die DNA in eine Form zurückverwandelt, die der einer embryonalen Zelle ähnelt. Bringt man nun den ruhenden G₀-Zellkern in eine zuvor entkernte Eizelle, beginnt er sich wieder zu teilen. Diese Eizelle pflanzt man dann einem weiblichen Tier ein, wo sie sich zu einem Embryo entwickelt. Wenn alles glatt verläuft, kommt schließlich ein Jungtier zur Welt (Abb. 15.18).

Anfang 1996 wurde am Roslin Institute in Schottland das erste geklonte Säugetier der Welt geboren, das Schaf Dolly. Der Spenderkern stammte aus einer Euterzelle eines trächtigen Weibchens. Seit der Geburt von Dolly wurden noch verschiedene andere Tiere erfolgreich geklont, beispielsweise Rinder, Schweine, Ziegen, Mäuse und Katzen (Tabelle 15.1). Dolly wurde verpaart und brachte an Ostern 1998 selbst ein Lamm namens Bonnie zur Welt.

Genau genommen handelte es sich bei Dolly nicht um einen vollständigen Klon. Außer im Zellkern, der den überwiegenden Teil der genetischen Information enthält, befinden sich in tierischen Zellen auch noch



15.18 Schema der Klonierung eines Schafes

Um ein Tier wie ein Schaf zu klonen, isoliert man zunächst Zellen des Euters, züchtet diese in Zellkultur und lässt sie dann verhungern, um sie in der G₀-Phase des Zellzyklus anzuhalten. Zusätzlich entnimmt man unbefruchtete Eizellen eines anderen Schafes und entfernt daraus den Zellkern. Durch einen elektrischen Reiz werden die Euterzelle in der G₀-Phase und die entkernte Eizelle miteinander verschmolzen. Dadurch gelangt ein somatischer Zellkern in ein undifferenziertes Cytoplasma. Die so entstandenen Eizellen werden in eine Leihmutter verpflanzt. Die DNA der Nachkommen kann man dann daraufhin untersuchen, ob sie identisch mit der des Spenderschafes ist.

Tabelle 15.1 Geklonte Tiere

Tier	Jahr	Name/Anmerkung
Schaf	1996	Dolly
Maus	1997	Cumulina (gefolgt von 50 weiteren!)
Rind	1998	
Ziege	1999	
Schwein	2000	
Gaur	2000	Noah (bedrohtes asiatisches Wildrind; starb nach 2 Tagen an einer Infektion)
Mufflon	2001	bedrohtes Wildschaf (aus einem gerade verstorbenen Tier geklont)
Katze	2001	CopyCat
Kaninchen	2002	
Banteng	2003	bedrohtes javanisches Wildrind
Ratte	2003	
Maultier	2003	Idaho Gem
Pferd	2003	
Hirsch	2003	
Falbkatze (Afrikanische Wildkatze)	2003–4	Ditteaux (männlich), Madge und Caty (weiblich)
Hund	2005	Snuppy

einige Gene in den Mitochondrien. Im Fall von Dolly wurde nur die Kern-DNA kloniert. Die mitochondriale DNA stammte von der Eizelle, in die der Zellkern transplantiert wurde.

Nach dem Klonschaf Dolly wurden noch weitere Säugetiere geklont. Die Erfolgsrate ist jedoch nach wie vor gering.

Praktische Gründe für das Klonen von Tieren

Warum sollte man Schafe klonen? Abgesehen davon, dass man damit zeigen möchte, dass man ganze Tiere klonen kann, gibt es auch noch praktische Gründe. Der Mensch hat schon seit Jahrtausenden versucht, Nutztiere durch Züchtung zu verbessern. Durch genetische Duplikation kann ein verbessertes Tier relativ rasch weite Verbreitung erlangen.

Außerdem liefert eine Gruppe genetisch identischer Tiere Wolle, Milch, Fleisch oder Eier von standardisierter Qualität. Andererseits sind genetisch identische Tiere auch alle anfälliger für die gleichen Infektionen, sodass sich Epidemien leichter und schneller ausbreiten können.

Obwohl durch Klonen identische Tiere entstehen, könnte diese Technik paradoxerweise dazu beitragen, die genetische Vielfalt zu erhalten. So hat man beispielsweise in Neuseeland die letzte überlebende Kuh einer seltenen Rasse geklont. Durch Klonen kann man also seltene Rassen von Haustieren oder bedrohte Wildtierarten genetisch retten und vermeidet dabei, dass ihre Gene mit Fremdgenen vermischt werden, wie es bei der Hybridzucht der Fall ist. Tabelle 15.1, in der die bislang geklonten Tiere aufgeführt sind, enthält auch drei seltene Tierarten: Gaur, Mufflon und Banteng.

Die bedeutendste Anwendungsmöglichkeit des Klonens ergibt sich im Zusammenhang mit der transgenen Technologie. Neu geschaffene transgene Tiere können durch Klonen rascher verbreitet werden. Man kann die transgene DNA jedoch auch

Exkurs 15.3

Nachruf für Dolly, das Schaf

Im Februar 2003 wurde das Schaf Dolly im Alter von sechseinhalb Jahren durch eine tödliche Spritze eingeschläfert, weil es sich eine Virusinfektion zugezogen hatte, durch die Lungenkrebs entstanden war. Tiere von Dollys Rasse „Finn Dorset“ erreichen oft ein Alter von elf bis zwölf Jahren. Wie die meisten Klontiere starb auch Dolly etwas früher. Ihre Telomere waren um 20 % kürzer als für Schafe ihres Alters üblich. Das könnte zum vorzeitigen Altern beigetragen haben. Bei der Autopsie konnte man jedoch außer Arthritis keinerlei Anzeichen für ein vorzeitiges Altern feststellen. Zudem war Dolly übergewichtig – vermutlich aufgrund der vielen Leckerbissen, die sie wegen ihrer Berühmtheit erhielt; das könnte zur Entwick-

lung der Arthritis beigetragen haben. Möglicherweise war Dolly aber auch als Folge des Klonens weniger robust und anfälliger für Infektionen. Allerdings stirbt auch eine erhebliche Zahl anderer, normaler Schafe an ähnlichen Virusinfektionen, insbesondere bei Haltung unter beengten Bedingungen. Insgesamt gesehen lassen sich anhand eines Einzeltieres unmöglich definitive Schlüsse in dieser Angelegenheit ziehen, so berühmt es auch sein mag. Dollys Nachkommen, das 1998 geborene Lamm Bonnie und ein späterer Drillingswurf, zeigten keine signifikant verkürzten Telomere. Diese Nachkommen wurden aber auch auf natürlichem Wege gezeugt, sodass natürlich die Hälfte ihrer DNA von ihren Vätern stammte.

direkt während des Klonierens einbauen. Am Roslin Institute, wo Dolly zur Welt kam, wurde mittlerweile ein Schaf geklont, welches das Gen für den **humanen Faktor IX** trägt. Das Transgen wurde in Zellkultur in die Kernspenderzellen eingebaut. Man hat noch zahlreiche weitere transgene Tiere geklont, die Gene für pharmazeutisch wichtige Proteine tragen.

Warum Dolly aus einer Milchdrüsenzelle geklont wurde, sollte inzwischen klar sein. Wenn in diesem Gewebe ein fremdes Protein exprimiert wird, so wird es in die Milch sezerniert und kann problemlos kommerziell gewonnen werden. Hat man in der Kultur eine gute transgene Zelllinie etabliert, so kann man zu Produktionszwecken mittels Kerntransplantation mehrere genetisch identische Tiere erzeugen. Durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff kann man solche transgenen Zellen auf lange Sicht aufbewahren. Man spricht dann von sogenannten „Prototieren“.

Geklonte Tiere kann man durch transgene Techniken verändern und auf diese Weise Tiere mit nützlichen Eigenschaften rascher vermehren als durch herkömmliche selektive Züchtung.

Verbesserung von Nutztieren durch Stoffwechsel-Engineering

Zur Produktion verbesserter Nutztiere kann man auch Stoffwechsel-Engineering mit Klonen kombi-

nieren (statt einfach nur transgene Tiere als Quelle einzelner nützlicher Proteine zu verwenden). So fehlen Säugetieren beispielsweise die Gene für den Cysteinbiosyntheseweg. Folglich können Säugetiere, also auch Schafe, die schwefelhaltige Aminosäure Cystein nicht selbst synthetisieren, sondern müssen sie mit ihrer Nahrung aufnehmen. Manchmal ist Cystein für die Bildung der Wolle limitierend. Zusätzliche Cysteingaben mit der Nahrung erweisen sich als nicht besonders erfolgreich, da es von Mikroorganismen im Darm der Schafe aufgenommen und abgebaut wird.

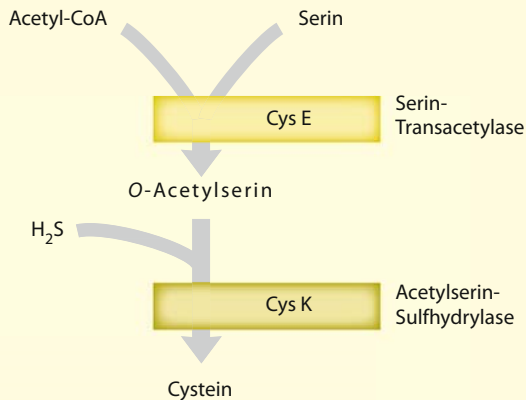
Viele Bakterien synthetisieren jedoch Cystein. Dazu sind zwei Schritte erforderlich, ausgehend von der Aminosäure Serin plus anorganischem Sulfid (Abb. 15.19). Bei Darmbakterien werden die beiden ausschlaggebenden Enzyme **Serin-Transacetylase** und **Acetylserin-Sulphydrylase** von den Genen *cysE* beziehungsweise *cysK* codiert. Diese beiden Bakteriengene hat man aus *Salmonella* kloniert und der Kontrolle des Metallothionein-Promotors unterstellt. Dieses Konstrukt wurde erfolgreich in transgene Mäuse eingebaut, die beide Enzyme exprimierten. Diese Mäuse blieben zudem auch dann gesund, wenn man ihnen die beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin vorenthielt, und stellten ihr eigenes Cystein her. Die Tiere benötigten in ihrem Futter auch kein anorganisches Sulfid.

Es ist zwar gelungen, transgene Schafe mit den bakteriellen Genen *cysE* und *cysK* zu erzeugen, eine umfangreiche Expression dieser Gene und die Synthese von Cystein an den erwünschten Stellen (in der Schleimhaut des Pansens) konnte man bisher aller-

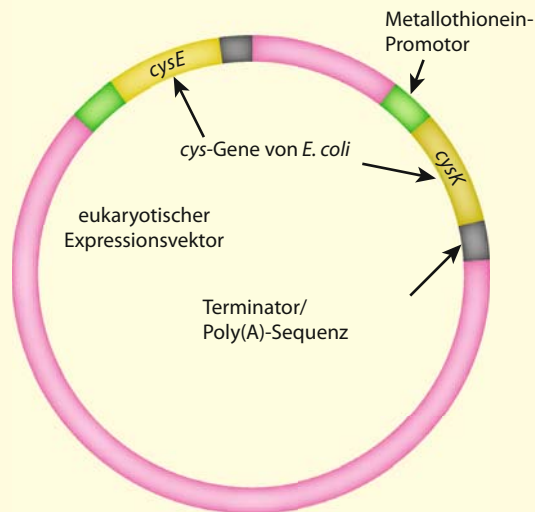
dings noch nicht zustande bringen. Mehrere weitere Projekte zur Verbesserung von Nutztieren, etwa zur Synthese anderer essenzieller Aminosäuren wie Lysin und Threonin, befinden sich gerade in den ersten Versuchsstadien.

Eine signifikante Verbesserung von Nutztieren ließe sich durch den Einbau von Stoffwechselwegen zur Synthese essenzieller Aminosäuren erzielen, denn diese Aminosäuren müssen gegenwärtig mit dem Futter zur Verfügung gestellt werden. Bislang hat man mit Mäusen als Modellorganismen lediglich einen Teilerfolg erzielt.

a Cysteinbiosyntheseweg



b Vektor mit klonierten *cys*-Genen



15.19 Biosynthese von Cystein aus Serin und Sulfid

a Der Cysteinbiosyntheseweg nutzt Serin und Acetyl-CoA. Zunächst werden Acetyl-CoA und Serin durch Serin-Transacetylase in O-Acetylserin umgewandelt. Anschließend wandelt Acetylserin-Sulphydrylase O-Acetylserin mithilfe von Hydrogensulfid (Schwefelwasserstoff, H_2S) in Cystein um.
b Der Cysteinbiosyntheseweg wurde in einen eukaryotischen Expressionsvektor geklont. Die beiden *E. coli*-Gene sind hinter den Metallothionein-Promotor der Maus geklont.

Probleme und ethische Fragen bei der Kerntransplantation

Beim Klonen wird mittels gentechnologischer Eingriffe ein exaktes genetisches Duplikat eines Tieres erzeugt. Dabei ist zu bedenken, dass man nicht gleich ein ausgewachsenes Duplikat erhält: Ausgehend von einer einzelnen Zelle, die sich zu einem Embryo entwickelt, muss das geklonte Tier erst die Kindheit durchlaufen, bis es erwachsen ist.

Und wie steht es mit dem Klonen von Menschen? Auf die Geburt des Klonschafes Dolly folgten heftige ethische Debatten. Viele Kritiker sehen im Klonen von Menschen eine Bedrohung für die Unantastbarkeit menschlichen Lebens. Dabei gibt es bereits menschliche Klone. Eineiige Zwillinge, Drillinge usw. sind Klone, die durch Teilung aus derselben befruchteten Eizelle hervorgingen. In vielen alten Kulturen galten eineiige Zwillinge als etwas Übernatürliches: in einigen als glückbringend, in anderen hingegen als böses Omen, sodass man sich gezwungen sah, einen von beiden zu töten.

Ganz abgesehen von den moralischen Bedenken bereitet das Klonen von Menschen auch große praktische Probleme. Die Zahl der lebend geborenen Klone entspricht lediglich wenigen Prozent der transplantierten Zellkerne. Zur gleichen Zeit wie Dolly wurden noch weitere Lämmer erzeugt, die in einem späten Stadium der Schwangerschaft oder kurz nach der Geburt verstarben; einige von ihnen zeigten Entwicklungsanomalien. Klonen ist also ziemlich riskant. Außerdem schätzt man die Chancen einer erfolgreichen Schwangerschaft bei einer Implantation in eine menschliche Leihmutter um das Drei- bis Zehnfache geringer ein als bei Schafen. Die Kosten und Mühen zur Produktion eines geklonten Menschen wären also weitaus größer als bei Tieren. Sieht man von Science-fiction-Szenarien ab, so ist zudem nicht klar, warum

der Mensch sich überhaupt selbst klonen möchte. Der zeitliche Ablauf der menschlichen Entwicklung würde einem geklonten menschlichen Duplikat kein langes Leben bescheren.

Das Klonen von Menschen ist nicht nur mit vielen moralischen Bedenken verbunden, sondern wirkt auch gewaltige praktische Probleme auf.

Genetisches Imprinting und Entwicklungsprobleme bei geklonten Tieren

Selbst wenn alle technischen Probleme bewältigt sind, schlagen die meisten Versuche, Tiere zu klonen, dennoch fehl. Für eine erfolgreiche Kerntransplantation muss ein Zellkern aus einer differenzierten Zelle umprogrammiert werden. Das ist ein sehr komplexer Prozess. Vermutlich ist die geringe Erfolgsrate darauf zurückzuführen, dass diese Umprogrammierung nicht richtig gelingt. Nach neuesten Untersuchungen ist die Methylierung der DNA wohl der ausschlaggebende Faktor hierfür.

Die Methylierungsmuster geklonter Embryonen gleichen nicht denen natürlicher Embryonen. Das gilt selbst für die meisten Tiere, bei denen eine erfolgreiche Klonierung gelungen ist. Dolly und andere geklonte Tiere haben jedoch genetisch normale Nachkommen hervorgebracht. Beim Klonen gelangen also keine permanenten genetischen Veränderungen in die Keimbahn der Tiere.

Im Allgemeinen werden durch Methylierung eukaryotische Gene abgeschaltet, die in einem bestimmten Gewebe oder Entwicklungsstadium nicht benötigt werden. Die Methylierung ist auch am sogenannten **genetischen Imprinting** oder der **genetischen Prägung** beteiligt. Durch diesen Regulationsmechanismus wird nur die mütterliche oder väterliche Kopie eines Gens aktiviert (mehr zum Imprinting s. Kap. 16). Beim Menschen gibt es etwa 30 geprägte Gene. Wenn die väterliche Kopie aktiv ist, wird gewöhnlich das Wachstum des Fetus gefördert, ist jedoch die mütterliche Kopie aktiv, so ist das Wachstum eingeschränkt. Wie zu erwarten, führen falsche Prägungsmuster daher zu Wachstums- und Entwicklungsstörungen beim Fetus, wie man sie bei vielen durch Klonen erzeugten Embryonen feststellen kann.

Geklonte Säugetiere zeigen häufig das **LOS-Syndrom** (engl. *large-offspring syndrome*): Ihre Extremitäten, inneren Organe und auch der Körper insgesamt sind abnormal groß, und der Gesundheitszustand dieser Tiere ist schlecht. Dieses Syndrom steht in Zusammenhang mit einem falschen Imprinting des Gens *IGF2R* für den Insulinwachstumsfaktor-2-Rezeptor. Normalerweise zeigt dieses Gen bei Säugetieren mütterliches Imprinting. Bei Feten mit dem LOS-Syndrom stellte man am *IGF2R*-Gen eine veränderte Methylierung fest, und es wurde in geringerem Maße exprimiert als normal. Merkwürdigerweise wird das *IGF2R*-Gen bei Primaten nicht genetisch geprägt. Menschen und Affen sollten daher weniger anfällig gegen das LOS-Syndrom sein, sodass weniger Schäden beim Klonen zu erwarten wären.

Beim Klonen von Säugetieren ergibt sich eine hohe Misserfolgsrate. Ausschlaggebender Faktor hierfür ist wahrscheinlich das Methylierungsmuster der DNA, bei dem sich Unterschiede zeigen zwischen natürlichen Embryonen und solchen, die durch Klonen entstanden sind.

Transgene Menschen, andere Primaten und Haustiere

Der erste erfolgreiche Versuch, einen transgenen Primaten zu erzeugen, gelang Ende 2000 mit der Geburt des Rhesusaffen ANDi, der das *gfp*-Gen trug. ANDi steht für „insertierte DNA“ (rückwärts gelesen). Das Gen für GFP wurde mittels eines verkrüppelten Retrovirus als Vektor in unbefruchtete Eizellen übertragen, die anschließend *in vitro* befruchtet wurden. Durch die Behandlung von 224 Eizellen erhielt man 20 Embryonen. Diese führten zu fünf Schwangerschaften, aus denen letztlich drei lebende männliche Affen hervorgingen. Von diesen war nur einer transgen und hatte das GFP exprimiert: ANDi. Trotzdem fluoreszierte ANDi nicht grün, weil die Menge an GFP zu gering war (und der Körper von Rhesusaffen zudem weitgehend von einem braunen Fell bedeckt ist).

Mehrfach wurde überspitzt behauptet, Primaten geklont zu haben. Man hat durch Teilen eines Embryos im Achtzellstadium vier genetisch identische Zweizellembryonen geschaffen und dies dann als

„Klonen“ verkauft. In Wirklichkeit handelt es sich dabei nur um künstlich erzeugte Zwillinge und nicht um eine echte Kerntransplantation wie bei Dolly. Ende 2007 gelang dann das Klonen von Embryonen aus Hautzellen eines Rhesusaffen.

Es scheint keinen Grund dafür zu geben, warum das Klonen von Affen, Menschenaffen und Menschen mittels Kerntransplantation technisch nicht möglich sein sollte. Das potenzielle Ziel des Klonens von Menschen wäre nicht, neue Individuen zu erzeugen, sondern Gewebe zur Transplantation zu erhalten. Man könnte zu diesem Zweck umprogrammierte menschliche Zellen in Zellkultur bereithalten. Man spricht in diesem Fall von **therapeutischem Klonen**. Auf diesem Gebiet sind in nächster Zeit rasche Fortschritte zu erwarten.

Zum Abschluss dieses Abschnitts noch eine kleine Anekdote: Im November 2001 wurde an der Texas A&M University das erste Heimtier geklont, die Katze CC (für CopyCat; Abb. 15.20). Das Ziel dieses Klonprogramms lautete, die Liebingshaustiere von Menschen zu klonen, die dafür genügend Geld haben. Das erinnert zwangsläufig an die alten Ägypter, die neben Menschen auch ihre Katzen mumifizierten. CC hat als einziger von 87 implantierten Embryonen überlebt. Damit ähnelt die Erfolgsrate jener für Klonschafe, Klonmäuse usw. Wirtschaftlich rechnen könnte sich ein routinemäßiges Klonen von Heimtieren nur bei einer höheren Erfolgsrate.

Mithilfe von Retroviren als Vektoren konnten transgene Rhesusaffen erzeugt werden. Mittlerweile ist es auch gelungen, als erste Primaten Rhesusaffen zu klonen.

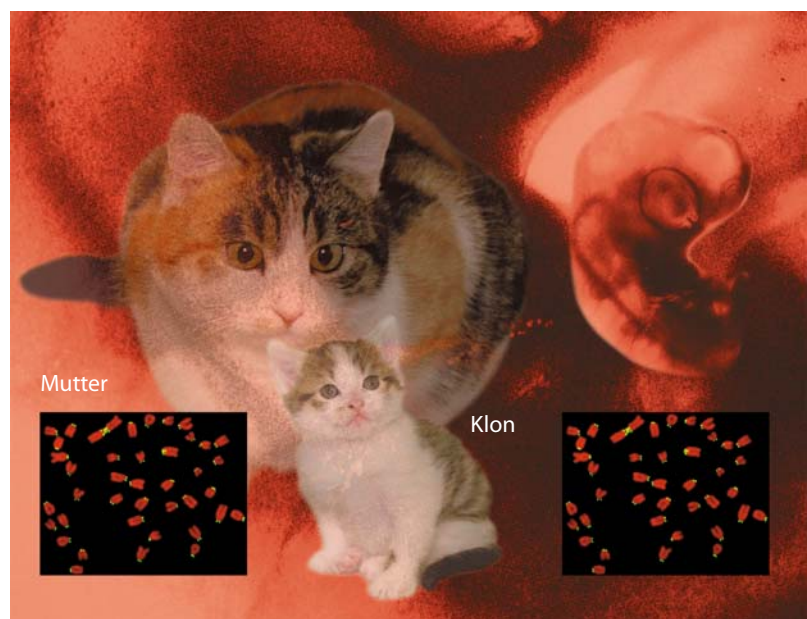
Anwendung der RNA-Technologie in der Transgenik

Wie bereits erläutert, ermöglichen transgene Techniken auf Ebene der DNA, durch Insertion zusätzliche Gene einzubauen und die Genexpression zu inaktivieren. Man kann Gene jedoch auch auf Ebene der RNA manipulieren: mithilfe der **Antisense-Technik**, von **Ribozymen** oder durch **RNA-Interferenz**. Diese Methoden wurden bereits behandelt (s. Kap. 5); deshalb sind in diesem Abschnitt nur die Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der Transgenik zusammengefasst.

Zum Erzeugen eines transgenen Organismus kann man auch ein Antisense-Transgen einbauen. Am einfachsten lässt sich ein Antisense-Gen durch Umkehr (Invertieren) der DNA-Sequenz des Originalgens konstruieren. Bei höheren Organismen verwendet man die cDNA-Version dieses Gens als Ausgangspunkt, um Komplikationen durch intervenierende Sequenzen zu vermeiden. Bei der Transkription eines

15.20 Ein Klon ist keine Kopie

Diese digitale Bildmontage zeigt CopyCat und ihre Mutter Rainbow. CC ist ein echter, durch Kerntransplantation erzeugter Klon. Das Calico-Katzenweibchen Rainbow diente als Spender des Zellkerns. Daher weisen beide Katzen identische Chromosomen auf. Obwohl es sich bei CC also um einen echten Klon handelt, sieht sie anders aus als die Kernspenderin. Das liegt daran, dass das Fellmuster von Katzen teilweise durch zufällige Zellteilungen zustande kommt sowie bei Weibchen durch X-gebundene Inaktivierung. Digitalbilder von Hunter O'Reilly, 2002.



solchen Antisense-Gens entsteht Antisense-RNA, die dann an die mRNA des entsprechenden *sense*-Gens bindet (s. Kap. 5). Dadurch ergibt sich eine Inhibition der Genexpression auf der Ebene der Translation.

Durch Insertion von Antisense-Genen in Mäuse konnte die Genexpression um 95 % inhibiert werden. Allerdings zeigen sich bei der Effektivität enorme Schwankungen. Die Antisense-RNA kann der vollen Länge des Sense-Gens entsprechen oder nur einem kurzen Abschnitt. Kurze Abschnitte, die zu der nichttranslatierten 5'-Region der Sense-mRNA komplementär sind, blockieren die Translation häufig besonders effizient. Offensichtlich kann man die Antisense-Konstrukte der Kontrolle induzierbarer Promotoren unterstellen. Dadurch sind die Wissenschaftler in der Lage, die Genexpression durch Antisense-Silencing zu regulieren.

Man kann auch transgene Konstrukte einbauen, die Ribozyme exprimieren. In diesen Fällen soll das entsprechende Ribozym in der Regel eine spezifische mRNA spalten. Wird das Ribozym exprimiert, so spaltet es die mRNA des Zielgens und verringert auf diese Weise dessen Expression. Gelegentlich wurde von Fällen bei *Drosophila* und Mäusen berichtet, bei denen durch die transgene Expression von Ribozymen die Genexpression erfolgreich herunterreguliert werden konnte.

Durch den Einbau von Genen, die für Antisense-RNA oder Ribozyme codieren und eine spezifische mRNA schneiden, lässt sich die Genexpression verringern.

Anwendungsmöglichkeiten der RNA-Interferenz in der Transgenik

RNA-Interferenz beinhaltet mehrere miteinander verwandte Phänomene. Über die Mechanismen ist immer noch zu wenig bekannt, es entsteht jedoch stets eine doppelsträngige RNA (dsRNA). Diese wird normalerweise weder in prokaryotischen noch in eukaryotischen Zellen gebildet. Infolgedessen wird sie von eukaryotischen Zellen als Hinweis auf virale Aktivität angesehen und daher abgebaut.

Ist in eukaryotischen Zellen sowohl Sense- als auch Antisense-RNA vorhanden, bildet sich eine dsRNA. Dies hat zur Folge, dass die Expression des entsprechenden Gens massiv absinkt. Das ist auf den Abbau

der mRNA zurückzuführen. Daher muss die dsRNA den Exonsequenzen des Zielgens entsprechen. Um diesen Effekt zu erzielen, sind nur wenige dsRNA-Moleküle erforderlich. Bei *Caenorhabditis elegans* stellt die RNA-Interferenz die bevorzugte Methode zur Inaktivierung von Genen dar, und auch bei anderen Tieren und bei Pflanzen erwies sie sich als sehr effizient.

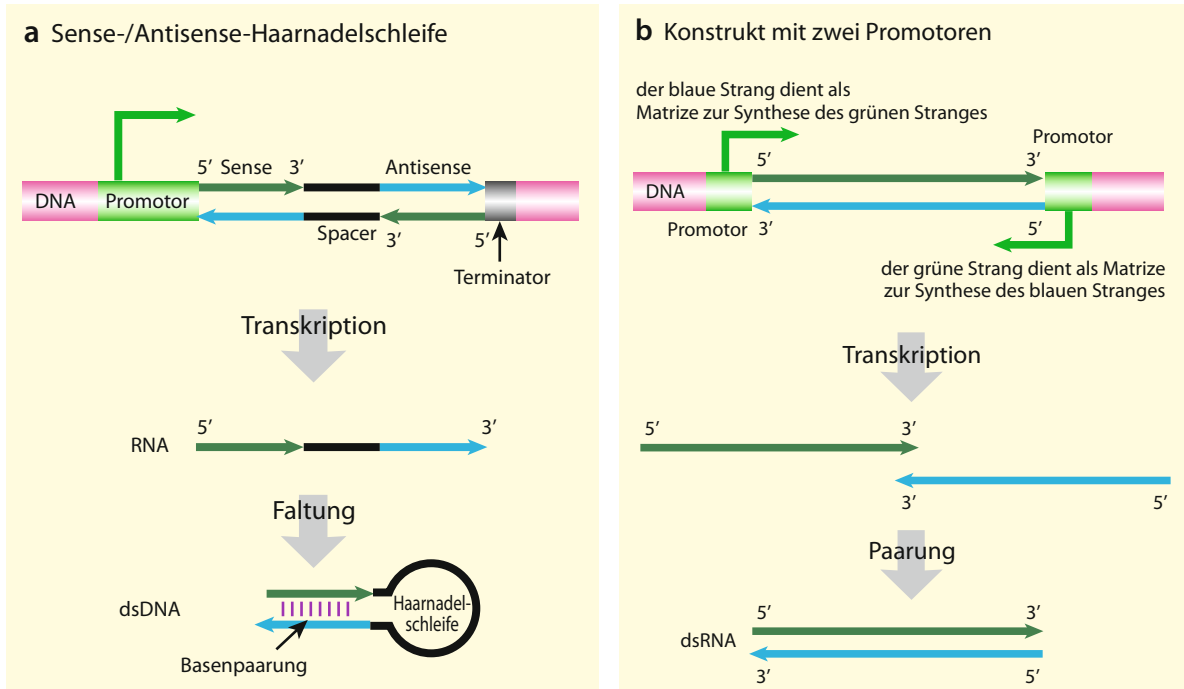
Auslösen kann man eine RNA-Interferenz durch direkte Zugabe von RNA oder durch Expression des entsprechenden transgenen DNA-Konstrukts. Durch ein Konstrukt mit benachbarten Sense- und Antisense-Sequenzen entsteht eine Haarnadelschleife in der RNA (Abb. 15.21). Alternativ kann man auch ein einzelnes Transgen verwenden, flankiert von zwei Promotoren in jeweils unterschiedlicher Ausrichtung.

Eine für Pflanzen charakteristische Form der RNA-Interferenz ist die **homologe Cosuppression**; gelegentlich kommt diese auch bei anderen Organismen vor. Hierbei wird durch das Vorhandensein mehrerer Kopien eines Transgens die Expression verwandter Wirtsgene (und auch des Transgens selbst) verringert. Gelegentlich können einzelne Kopien von Transgenen, die einem endogenen Wirtsgen hochgradig homolog sind, ausreichen, um eine Cosuppression zu bewirken. Der Mechanismus variiert von Fall zu Fall etwas, resultiert jedoch in der Bildung einer dsRNA, die dann eine RNA-Interferenz auslöst. Mithilfe von Transgenen, die durch RNA-Viren übertragen werden, lässt sich eine homologe Cosuppression besonders effektiv auslösen. Dies funktioniert allerdings nur, wenn das Virus noch zur Replikation imstande ist.

Mithilfe der RNA-Interferenz kann man die Expression ausgewählter Gene abschalten. Für die RNA-Interferenz sind verschiedene Konstrukte verfügbar, von denen einige auch in das Wirtsgenom eingebaut und weitervererbt werden.

Transgenik und Aufnahme von DNA in der Natur

Entwicklungsgeschichtlich betrachtet sind wir alle transgene Organismen. Das menschliche Genom enthält eine signifikante Zahl von Genen bakteriellen Ursprungs. Diese wurden wahrscheinlich in unterschiedlichen Stadien der Entwicklungsgeschichte von verschiedenen Bakterien aufgenommen. Zusätzlich besitzt der Mensch einige wenige Gene, die ur-



15.21 Konstrukte für RNA-Interferenz

RNA-Interferenz tritt auf, wenn sowohl die Sense- als auch die Antisense-RNA eines Gens vorhanden sind und eine dsRNA bilden. Hier abgebildet sind zwei Konstrukte, welche die Synthese eines dsRNA-Moleküls steuern. Beim ersten Konstrukt (a) sind eine Sense- und eine Antisense-Region vorhanden, die Basenpaarungen miteinander ausbilden. Getrennt sind diese beiden Regionen durch eine Spacersequenz, die bei Basenpaarung eine Haarnadelschleife bildet. Das Konstrukt mit doppeltem Promotor (b) enthält zwei Promotoren – einen für den Sense-Strang und einen für den Antisense-Strang. Die beiden resultierenden RNA-Moleküle sind komplementär und bilden ein dsRNA-Molekül. Die dsRNA löst den Abbau der mRNA des entsprechenden Gens aus.

sprünglich von anderen höheren Organismen stammen. Einige davon wurden durch Retroviren übertragen. Solche Übertragungen von Genen zwischen Organismen, die keine direkten Abkömmlinge sind, bezeichnet man im Allgemeinen als lateralen oder horizontalen Gentransfer. Genauso gut könnte man aber auch von „natürlicher Transgenese“ sprechen.

In der Natur gibt es vor allem zwei Wege, auf denen Organismen genetisches Material von anderen Organismen erhalten: zum einen durch virale Transduktion und zum anderen durch direkte Aufnahme von DNA. Mikroorganismen können DNA durch Transformation aus ihrer Umwelt aufnehmen. Tiere nehmen DNA ständig zusammen mit anderen Bestandteilen ihrer Nahrung auf. Bestimmte Protozoen wie *Paramecium* und einige Amöben ernähren sich von Bakterien. Man vermutet, dass einige am fermentativen Stoffwechsel von *Entamoeba* beteiligten Gene von solchen aufgenommenen Bakterien stammen.

Menschen und andere Säugetiere, ob Fleisch- oder Pflanzenfresser, nehmen ständig Nahrung zu sich, die beträchtliche Mengen DNA enthält. Auch wenn im Allgemeinen davon auszugehen ist, dass die aufgenommene DNA im Darmtrakt in Nucleotide abgebaut wird, ist das nicht immer der Fall. Wie Untersuchungen in jüngerer Zeit ergaben, bleibt ein sehr kleiner Teil der DNA in Form von Fragmenten moderater Größe (bis zu 1000 Basenpaaren) erhalten und passiert so die Darmwand des Tieres in den Blutkreislauf. Zumindest zeitweise lässt sich aus der Nahrung stammende DNA in verschiedenen Organen nachweisen und kann auch die Placenta passieren und so in Feten und Neugeborene gelangen.

Als Testmoleküle hat man DNA des Bakterienvirus M13 und das Gen für das grün fluoreszierende Protein verwendet. Vor kurzem konnte man natürlich vorkommende DNA-Sequenzen des Gens für die pflanzenspezifische Ribulose-1,5-bisphosphat-

Carboxylase (Rubisco) mittels PCR aufspüren. All diese fremden DNA-Sequenzen fand man im Blut sowie in den Zellkernen verschiedener Gewebe von Tieren, welche die DNA aufgenommen hatten. Mitunter wird die Fremd-DNA offenbar sogar in die chromosomale DNA der Wirte eingebaut. Bislang gibt es aber noch keinen Nachweis für die Expression von Genen aus DNA, die mit der Nahrung aufgenommen wurde. Auch einen Einbau von DNA, die Mäuse mit der Nahrung zu sich genommen hatten, in die Keimbahn konnte man noch nicht nachweisen. Wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass mit der Nahrung aufgenommene DNA das Genom infiltriert und exprimiert wird, ist nicht bekannt; sie scheint jedoch eher gering. Da eine riesige Zahl von Tieren über Millionen Jahre hinweg ihr ganzes Leben lang tagtäglich DNA mit der Nahrung aufgenommen hat, kann man sich vorstellen, dass dies ab und an vorkommt. Die Tatsache, dass das menschliche Genom einen kleinen Prozentsatz an Fremdgenen enthält, spricht dafür, dass ein Einbau in die Keimbahn erfolgt – wenn auch äußerst selten.

Aus rein theoretischer Sicht sollte man sich stets vor Augen halten, dass lebende Zellen weitaus mehr RNA als DNA enthalten. Die mit der Nahrung aufgenommene Menge an RNA übersteigt die Menge an DNA um mindestens das Zehnfache. Ob auch nur ein Teil dieser RNA lange genug überdauert, um die Darmwand zu passieren und in die Zellen der Tiere vorzudringen, wurde bislang noch nicht erforscht. Die Reverse Transkriptase (aus den in den meisten tierischen Genomen vorhandenen Retroelementen) könnte theoretisch aufgenommene RNA durch re-

verse Transkription wieder in eine DNA-Kopie umschreiben. Diese wird möglicherweise von Zeit zu Zeit in das Genom der Wirtszelle eingebaut.

Kurze Fragmente der mit der Nahrung aufgenommenen DNA können in Zellen gelangen und in die Wirtschromosomen eingebaut werden. Ob solche DNA auch in die Keimbahn von Säugetieren integriert werden kann, ist unbekannt.

► Weiterführende Literatur

- Christophides GK (2005) Transgenic mosquitoes and malaria transmission. *Cell Microbiol* 7: 325–333
- Houdebine LM (2007) Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol* 360: 163–202
- Melo EO, Canavessi AM, Franco MM, Rumpf R (2007) Animal transgenesis: State of the art and applications. *J Appl Genet* 48: 47–61
- Mitalipov SM, Wolf DP (2006) Nuclear transfer in nonhuman primates. *Methods Mol Biol* 348: 151–168
- Schenkel J (2006) Transgene Tiere, 2. Aufl. Springer, Heidelberg
- Trounson AO (2006) Future and applications of cloning. *Methods Mol Biol* 348: 319–332
- Vilaboa N, Voellmy R (2006) Regulatable gene expression systems for gene therapy. *Curr Gene Ther* 6: 421–438
- Wheeler MB (2007) Agricultural applications for transgenic livestock. *Trends Biotechnol* 25: 204–210
- Whitelaw CB, Sang HM (2005) Disease-resistant genetically modified animals. *Rev Sci Tech* 24: 275–283

Genetische Störungen

Einführung

Genetische Störungen bei höheren Organismen

Auf mehreren Genen beruhende Erbdefekte

Störungen aufgrund von Haploinsuffizienz

Dominante Mutationen können positiv oder negativ sein

Schädliche Tandem-repeats und dynamische Mutationen

Störungen bei Imprinting und Methylierung

Mitochondriale Defekte

Identifizieren, Lokalisieren und Klonieren defekter Gene

Cystische Fibrose

Muskeldystrophie

Genetische Analysen und Beratung

Weiterführende Literatur

Einführung

Genetische Defekte können sich sehr unterschiedlich auswirken: von belanglos bis hin zu lebensbedrohlich. Genetische Störungen wie Diabetes oder Muskeldystrophie werden in der Regel als Krankheiten erachtet, andere hingegen, wie Gaumenspalten und Farbenblindheit als Erbdefekte. Bei allen handelt es sich jedoch um das Ergebnis von Mutationen des genetischen Materials, der DNA. Manche Krankheiten werden direkt durch Mutationen hervorgerufen, aber auch die Anfälligkeit für Infektionskrankheiten und andere schädliche Umwelteinflüsse wie Strahlung wird durch die Gene beeinflusst.

Die genaue Mutationsrate abzuschätzen, ist recht schwierig. Beim Menschen und bei Menschenaffen liegt sie pro Generation bei ungefähr $5,0 \times 10^{-8}$ pro Kilobase DNA. Bei Nagetieren beträgt die Rate nur etwa ein Zehntel davon, weil hier für die Bildung von Gameten aus Keimzellvorläufern weniger Zellteilungen erforderlich sind. In der Keimbahn von Menschen und anderen Tieren sammelt sich also mit der Zeit eine beträchtliche Zahl von Mutationen an. Die meisten davon wirken sich kaum oder gar nicht aus, durch einen kleinen Prozentsatz entstehen jedoch schwere Erbdefekte. Im Internet ist unter der Bezeichnung OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) eine vollständige Auflistung der genetischen Störungen beim Menschen abrufbar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

Mutationen im menschlichen Genom sind die Ursache für eine Vielzahl von genetischen Störungen und Erbkrankheiten.

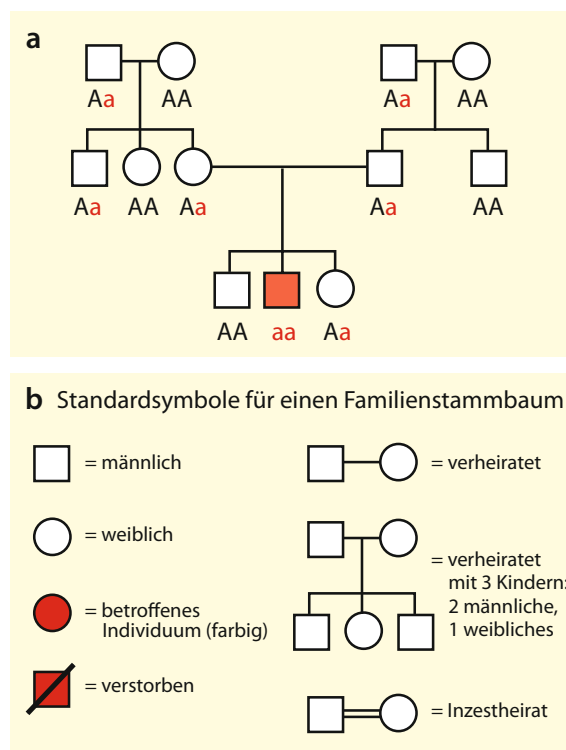
Genetische Störungen bei höheren Organismen

Tritt in der DNA eines einzelligen Organismus eine Mutation auf, so wird diese durch die Zellteilung an alle Nachkommen weitergegeben. Bei vielzelligen Tieren ergibt sich eine komplexere Situation. Bei Tieren dienen nur die Zellen der Keimbahn der Fortpflanzung; aus ihnen gehen bei geschlechtsreifen Individuen die Eizellen und Spermien hervor. Die somatischen Zellen, welche den übrigen Körper bilden, werden nicht an die nächste Generation weitergege-

ben (s. Kap. 1). Bei der Entstehung von Krebs kommt es jedoch zu Mutationen somatischer Zellen; dieses Thema wird separat in Kapitel 18 behandelt.

Höhere Organismen wie Tiere und Pflanzen sind normalerweise diploid und besitzen zwei Kopien (d.h. zwei Allele) jedes Gens. Wird eine der Kopien durch eine Mutation geschädigt, kann die andere Kopie diesen Verlust kompensieren. Da die meisten Mutationen relativ selten auftreten, ist es unwahrscheinlich, dass beide Allele eines Gens von Mutationen betroffen sind. Überdies sind die meisten nachteiligen Mutationen gegenüber dem Wildtyp rezessiv (Abb. 16.1 und Tabelle 16.1). Deshalb reicht ein einzelnes funktionsfähiges Allel für eine normale Entwicklung, und die defekte Kopie wirkt sich nicht merklich auf den Phänotyp aus.

Dennoch weisen alle Menschen verstreut unter den 25 000 menschlichen Genen einige wenige Muta-



16.1 Vererbung rezessiver Mutationen

Normalerweise treten schädigende Mutationen nur in einer Kopie eines Gens auf. Daher besitzen die meisten Betroffenen eine normale Kopie (A) und eine mutierte Kopie (a) des Gens. Wenn jedoch zwei Menschen, die beide eine rezessive Mutation des gleichen Gens tragen, miteinander Kinder bekommen, werden 25 % dieser Kinder beide mutierte Kopien erben und die entsprechende Krankheit haben.

tionen auf. Nahe Verwandte teilen erwartungsgemäß viele Defekte. Geschwister haben jeweils die Hälfte ihrer genetischen Information gemeinsam, ebenso Kinder mit ihren Eltern – aber natürlich nicht mit jedem dieselbe Hälfte. Daher ist bei Kindern, die aus Beziehungen naher Verwandter hervorgehen (z.B. Bruder/Schwester oder Vater/Tochter), die Wahrscheinlichkeit, zwei Kopien desselben Defekts zu erben, also homozygot für das rezessive Allel zu sein, sehr stark erhöht (Abb. 16.2).

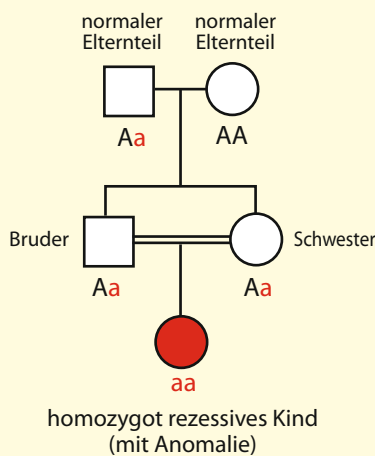
Ehen zwischen nahen Verwandten, selbst Cousins und Cousinen, erhöhen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Erbkrankheiten. Dies kommt dadurch zustande, dass ein seltenes rezessives Allel, das bei einem Vorfahren vorhanden ist, auf beiden Seiten der Familie weitergegeben wurde, und nun ein Kind von beiden Seiten jeweils eine der defekten Kopien erbt. An den Königshäusern in Europa wurde lange darauf bestanden, dass die Kinder andere Adlige ehelichen. Daher kam es zwangsläufig zu vielen Ehen

zwischen nahen Verwandten und in der Folge zu zahlreichen Erbdefekten bei den Nachkommen. Am bekanntesten sind die Fälle von Hämophilie (Bluterkrankheit). Aus Ehen zwischen Nichtverwandten hervorgehende Kinder sind nur dann von rezessiven Krankheiten betroffen, wenn durch Zufall jeweils ein Vorfahre von beiden Seiten der Familie Träger einer Kopie des defekten Allels war. Dies bildet auch die Grundlage für das in den meisten Gesellschaften vorherrschende Inzesttabu. Welche Verwandtschaftsbeziehungen unter das Inzesttabu fallen, ist in den verschiedenen Kulturen jedoch äußerst unterschiedlich.

Viele genetische Störungen wirken schon auf Spermienzellen, befruchtete Eizellen oder frühe Embryonalstadien tödlich und treten bei Erwachsenen erst gar nicht zutage. Trotzdem treten auch bei lebenden Menschen noch zahlreiche Erbdefekte auf. Einige der häufigsten Störungen sind auf Mutationen an einem einzelnen Gen zurückzuführen (s. Tabelle 16.1). Soweit nicht anders angegeben, sind sie rezessiv – es

Tabelle 16.1 Einige genetische Störungen beim Menschen, die auf einer Mutation eines einzelnen Gens beruhen

Krankheiten	Häufigkeit
Adenosin-Desaminase-Mangel (ADA-Mangel) ein Fehlen des Enzyms verursacht Immunschwäche erste Erbstörung, zur deren Behandlung eine Gentherapie zugelassen wurde	selten
cystische Fibrose Defekt beim Ionentransport wirkt sich indirekt auf die Schleimsekretion in der Lunge aus	1:2000 (weiße Bevölkerung) selten bei Asiaten
Duchenne-Muskeldystrophie Abbau des Muskelgewebes Riesengen ist ein häufiges Ziel von Mutationen	1:3000 (Männer) (geschlechtsgebunden)
Fragiles-X-Syndrom häufige Form einer X-gebundenen geistigen Retardierung	1:1500 (Männer) 1:3000 (Frauen) (geschlechtsgebunden)
Hämophilie (Bluterkrankheit) Störung der Blutgerinnung	1:10 000 (Männer) (geschlechtsgebunden)
myotone Dystrophie genetisch dominante Form der Muskeldystrophie	1:10 000
Phenylketonurie (PKU) geistige Retardierung aufgrund eines Enzymmangels Nachweis bei Neugeborenen durch Urinanalyse durch spezielle Diät kann man die Symptome verhindern	1:5000 (Westeuropa) anderswo selten
Sichelzellanämie Defekt der β -Kette von Hämoglobin Heterozygote sind resistent gegen Malaria, Homozygote erkranken häufig in Afrika erste identifizierte molekulare Krankheit	1:400 (schwarze Bevölkerung der USA)



16.2 Entstehung von homozygot rezessiven Individuen durch Inzucht

Ein Bruder und eine Schwester können beide ein mutiertes Gen (a) von einem ihrer Eltern (in diesem Beispiel vom Vater) erben, sind aber dennoch nicht von der Krankheit betroffen, weil sie jeweils noch das zugehörige normale Gen ihrer Mutter geerbt haben. Wenn diese Geschwister jedoch miteinander ein Kind bekommen, kann dieses zwei Kopien des defekten Gens erben und die Symptome der genetischen Störung aufweisen.

müssen also beide defekten Allele vorhanden sein, damit die Symptome auftreten. Große Gene bieten auch größere Ziele für zufällige Mutationen. Die Gene für cystische Fibrose, Muskeldystrophie und Phenylketonurie sind alle abnormal groß. Alle drei Krankheiten treten relativ häufig auf.

Viele bekannte genetische Störungen sind auf homozygot rezessive Mutationen eines einzelnen Gens zurückzuführen.

Auf mehreren Genen beruhende Erbdefekte

Einige bekannte genetische Störungen fehlen in Tabelle 16.1, weil daran mehrere Gene beteiligt sind. Diese kann man in zwei Kategorien unterteilen. Einige Multigendefekte entstehen durch Wechselwirkungen zwischen mehreren Einzelgenen. Beispiele hierfür sind

Gaumenspalte, Spina bifida (Spaltwirbel, „offener Rücken“), bestimmte Formen von Krebs und Diabetes.

Andere Multigendefekte sind auf das Vorhandensein einer zusätzlichen Kopie eines gesamten Chromosoms zurückzuführen. In den meisten Fällen sind Defekte, an denen ganze Chromosomen beteiligt sind, letal, in einigen Fällen sind die Betroffenen jedoch lebensfähig. Am bekanntesten ist das **Down-Syndrom**. Es geht mit einer geistigen Retardierung einher und entsteht durch eine zusätzliche Kopie von Chromosom 21 (daher auch als Trisomie 21 bezeichnet). Die Gesamthäufigkeit von Down-Syndrom liegt bei 1:800. Bei Erbdefekten mit zusätzlich auftretenden ganzen Chromosomen erfolgt ein Fehler häufig bei der Zellteilung in der gerade befruchteten Eizelle; daher sind diese nicht erblich. Die relative Wahrscheinlichkeit für ein solches Unglück steigt mit dem Alter der Mutter. Dennoch werden die meisten Kinder mit Down-Syndrom von jungen Müttern geboren, was ganz einfach daran liegt, dass mehr jüngere Frauen Kinder bekommen. Zusätzliche Geschlechtschromosomen treten bei etwa einem von 1000 Individuen auf, wobei es drei relativ häufige Möglichkeiten gibt: XXY, XYY und XXX. Die XYY-Individuen sind dafür bekannt, dass sie angeblich zu Gewaltverbrechen neigen, und auch die anderen zeigen einige Anomalien.

Auf den Wechselwirkungen mehrerer Gene beruhende Erbdefekte sind schwierig zu analysieren.

Störungen aufgrund von Haploinsuffizienz

Mutationen, die einen Funktionsverlust bewirken, sind normalerweise rezessiv. Daher zeigt ein Defekt in nur einer der beiden Kopien eines diploiden Gens in den meisten Fällen kaum Auswirkungen. Nur selten reicht eine funktionsfähige Kopie eines Gens nicht aus. Diese Situation bezeichnet man als **Haploinsuffizienz**. Die meisten Fälle, bei denen es auf die „Dosis“ eines Gens ankommt, lassen sich durch die folgenden drei Gründe erklären:

1. Einige Proteine werden in bestimmten Geweben in besonders hohen Mengen benötigt. In diesen Fällen kann es sein, dass ein einzelnes funktionsfähiges Gen keine ausreichend hohen Transkriptions- und Translationslevels ermöglicht.

2. Manche Proteine interagieren mit anderen Proteinen in einem streng festgelegten Verhältnis. Dann kann es sich nachteilig auswirken, wenn einer dieser Bestandteile in einer abweichenden Menge produziert wird.
3. Einige Regulationsnetzwerke reagieren auf eine quantitative Weise. Daher kann die absolute Menge der daran beteiligten regulatorischen Proteine für die richtige Funktion entscheidend sein.

Ein Beispiel für den erstgenannten Fall ist das Protein **Elastin**. Es wird von dem *ELN*-Gen codiert, das auf Chromosom 7 in Bande 7q11 lokalisiert ist. Elastin ist in den elastischen Geweben von Haut, Lunge und Blutgefäßen enthalten. Bei Menschen mit einem einzelnen defekten *ELN*-Gen funktionieren die meisten elastischen Gewebe nach wie vor uneingeschränkt. Für die normale Funktion der extrem elastischen Aorta sind jedoch zwei Kopien des *ELN*-Gens erforderlich. Bei nur einer Kopie des *ELN*-Gens kann nicht genügend Elastin für dieses Gewebe hergestellt werden. Dadurch kommt es zu einer Verengung der Aorta, die mitunter operativ behoben werden muss; der Fachbegriff dafür lautet angeborene supralvalvuläre Aortenstenose (SVAS).

In der Regel reicht eine funktionsfähige Kopie eines Gens aus. Gelegentlich sind für eine optimale Aktivität jedoch zwei funktionsfähige Kopien erforderlich, sodass ein Defekt in einer Kopie einen Mangel hervorruft.

Dominante Mutationen können positiv oder negativ sein

Bisweilen verursacht eine Mutation eine Funktionsänderung oder sogar einen Funktionsgewinn bei dem resultierenden Genprodukt. In diesem Fall kann sich eine einzelne mutierte Kopie des Gens phänotypisch auswirken – d.h., die Mutation ist dominant. Mit einem Funktionsgewinn einhergehende Mutationen sind bei Erbkrankheiten relativ selten, jedoch häufig bei somatischen Mutationen, die Krebs verursachen (s. Kap. 18).

Funktionsgewinnmutationen (oder *Gain-of-function*-Mutationen) sind spezifischer als solche, die

zu einem Funktionsverlust führen. **Achondroplasie** oder chondrodystropher Zwergwuchs entsteht beispielsweise durch die Mutation einer einzelnen Kopie des *FGFR3*-Gens, das für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. *fibroblast growth factor receptor*, FGFR) Nr. 3 codiert. FGF-Rezeptoren sind der Signalübertragung dienende Proteine; d.h. sie erhalten Signale an der Zellmembran und übertragen diese Information an den Zellkern. Normalerweise werden sie nur aktiviert, wenn sie ein Signal von außerhalb der Zelle erhalten (also den FGF binden). Von den meisten Mutationen wird dieser Rezeptor inaktiviert, bei einigen wenigen, extrem seltenen Mutationen entstehen allerdings Rezeptoren, die trotz fehlendem externen Signal aktiv sind. Nur Mutationen, bei denen die Aminosäure Glycin an Position 380 durch Arginin ersetzt ist (Gly380Arg), verursachen Achondroplasie. Andere Mutationen an diesem Gen rufen auch andere Symptome hervor.

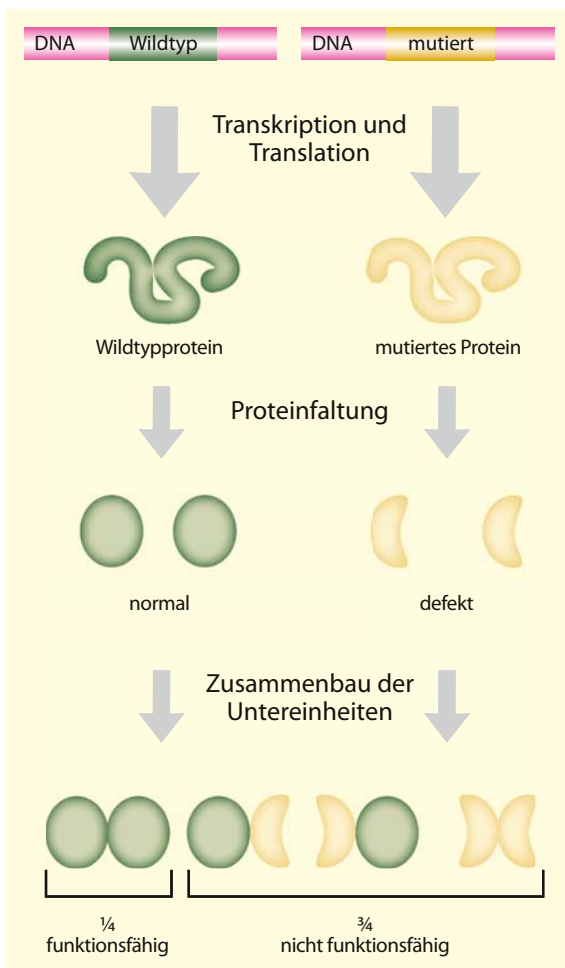
Als dominant-negative Mutationen bezeichnet man solche, bei denen das mutierte Protein seine eigene Funktion verliert und dieses defekte Protein zusätzlich die Funktion eines weiteren Proteins beeinträchtigt. Eine dominant-negative Mutation entsteht also gewöhnlich durch das Vorhandensein eines veränderten, defekten Proteins. Mutationen desselben Gens, durch die lediglich die Proteinsynthese aufgehoben wird, sind in der Regel rezessiv.

Beim einfachsten Szenario für eine dominant-negative Mutation bildet das betroffene Protein Oligomere. Wird durch eine Mutation die Proteinsynthese von einer Kopie des Gens verhindert, so reduziert sich einfach die Menge des synthetisierten Proteins um 50 %. Wenn durch das mutierte Allel jedoch ein verändertes Protein synthetisiert wird, kann es Bindungen mit normalen Kopien dieses Proteins eingehen und dadurch inaktive Komplexe bilden. Das kann schließlich sogar dazu führen, dass fast gar kein aktives Protein mehr verfügbar ist (Abb. 16.3). Viele Transkriptionsfaktoren binden als Dimere an die DNA und sind daher besonders anfällig für dominant-negative Effekte.

Proteine, die Ionenkanäle bilden, sind ebenfalls empfindlich für dominant-negative Effekte. Das mit Herzrhythmusstörungen einhergehende Romano-Ward-Syndrom entsteht durch eine dominante Mutation in dem Gen *KVLQT1*. Dieses codiert für ein Protein, das zusammen mit anderen am Aufbau eines transmembranen Kaliumkanals beteiligt ist. Bestimmte defekte *KVLQT1*-Proteine können zwar noch die zur Bildung des Kanals erforderliche Bin-

dung eingehen, beeinträchtigen aber die Funktion des Kanals. Bei diesem Syndrom ist die Aktivität auf nur noch 20 % verringert.

Auf dominanten Mutationen beruhende genetische Störungen sind selten. Häufig sind sie auf ein verändertes Protein zurückzuführen, das nicht nur defekt ist, sondern zudem noch die Funktion anderer Proteine beeinträchtigt.



16.3 Dominant-negative Mutationen

Dominant-negative Mutationen treten auf, wenn die defekte Kopie eines Gens die funktionsfähige beeinträchtigt. Beispielsweise kann ein defektes Protein an ein normales binden und dadurch dessen Funktion einschränken. Im abgebildeten Fall entfalten die Proteine ihre Funktion als Dimere. Ist das durch das mutierte Gen produzierte Protein defekt, bildet aber dennoch Dimere aus, so werden drei Viertel der gebildeten Komplexe funktionsunfähig sein.

Schädliche Tandem-repeats und dynamische Mutationen

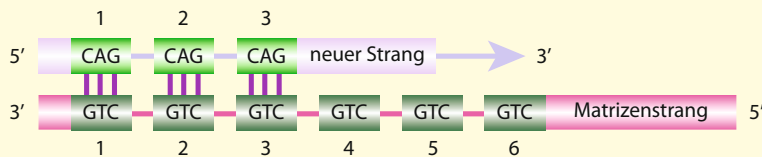
Bei einigen genetischen Störungen ist der Defekt nachweislich auf ein Tandem-repeat aus drei Basen innerhalb der codierenden Region eines Proteins zurückzuführen. Bei den drei Basen handelt es sich in der Regel um CAG (im codierenden Strang), die für Glutamin codieren. Das Wildtypallel enthält mehrere CAG-repeats, die mehrere hintereinanderfolgende Glutamineinheiten im codierten Protein zur Folge haben. Die mutierten Allele enthalten eine erhöhte Zahl dieser Wiederholungen, wodurch Proteine mit längeren **Polyglutaminbereichen** (Abb. 16.4) entstehen. Unterhalb einer bestimmten Zahl (im Allgemeinen im Bereich von fünf bis 30) sind diese Wiederholungen relativ harmlos und stabil. Oberhalb dieser Schwelle verursachen die Mutationen Krankheiten. Zusätzlich ist die Zahl der Wiederholungen instabil und steigt tendenziell mit jeder Generation, manchmal auf über 100. Deshalb spricht man bisweilen auch von **dynamischen Mutationen**. Allgemein gilt: Je höher die Zahl der Tandem-repeats, desto schlimmer die pathogenen Auswirkungen, und desto früher setzt die Krankheit ein.

Alle bekannten, durch Polyglutamin/CAG-Wiederholungen verursachten Defekte rufen neurodegenerative Erkrankungen hervor, die sich spät manifestieren. Fast alle sind autosomal dominant. Stets führen die ausgedehnten Polyglutaminabschnitte dazu, dass die Proteine zu Aggregaten verklumpen, die schließlich Nervenzellen zum Absterben bringen. Verschiedene durch CAG-repeats verursachte Erkrankungen betreffen unterschiedliche Proteine, die in verschiedenen Nervengeweben in unterschiedlichem Maße exprimiert werden. Folglich ergeben sich auch abweichende klinische Symptome. Die wohl bekannteste Erkrankung ist **Chorea Huntington**, die an Position 4p16 auf Chromosom 4 lokalisiert ist. Betroffen ist in diesem Fall offenbar der Transport von Vesikeln in Nervenzellen; die Folgen sind ein Verlust der Kontrolle über die Gliedmaßen, geistige Störungen und Demenz.

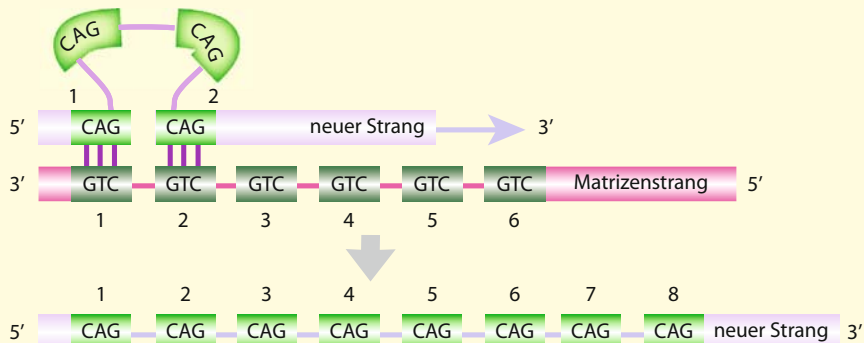
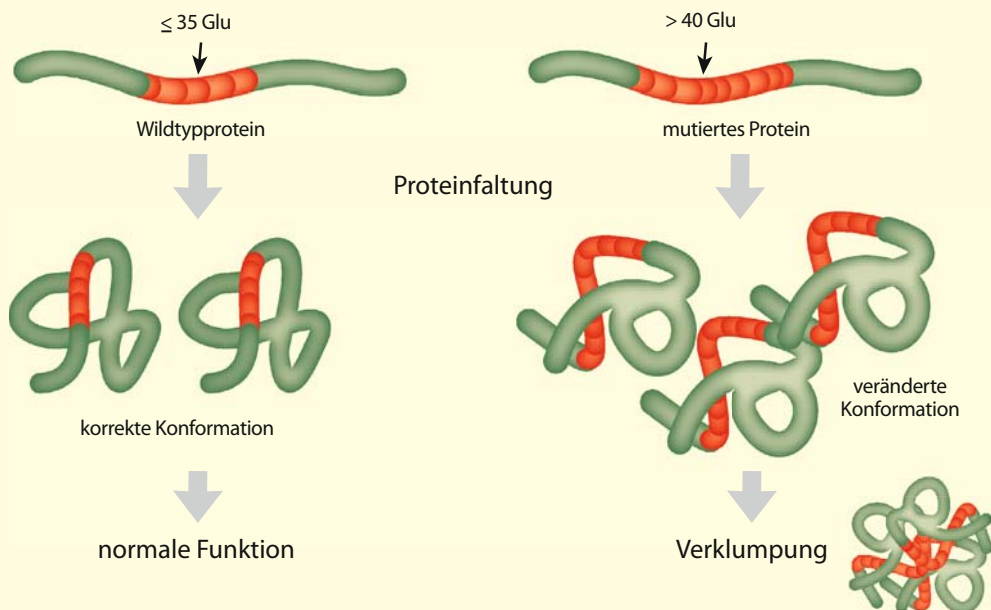
Tandem-repeats, die sich instabil ausdehnen, können auch außerhalb von codierenden Sequenzen auftreten. In einigen Fällen sind diese harmlos, in anderen beeinflussen sie die Expression von Genen in der Umgebung – mit verheerenden Folgen. Das gilt beispielsweise für **Fragiles-X-Syndrom**. Der Name bezieht sich auf eine fragile Stelle im langen Arm des X-Chromosoms, deren Auswirkungen man

a Abschnitt aus CAG-Tripletts in der DNA

normale DNA-Replikation



Zurückrutschen verursacht Duplikation

**b Abschnitt aus Polyglutaminbereichen im Protein****16.4 Tandem-repeats von CAG und Polyglutaminbereiche**

a Lange Abschnitte von CAG in der DNA können zu Fehlern bei der Replikation führen. Enthält eine Keimbahnzelle Abschnitte aus sechs CAG-Wiederholungen, so rutscht die DNA-Polymerase bisweilen bei der Replikation ab, sodass sich an dem neuen Strang eine Schleife bildet. Bei der Meiose enthält einer der Gameten dann acht statt sechs CAG-repeats.

b Normalerweise enthält das Protein weniger als 30 Glutaminreste und liegt in der korrekten Konformation vor. Bei mehr als 40 CAG-repeats verhindern die zusätzlichen Glutaminreste die korrekte Faltung des Proteins, was dazu führen kann, dass das Protein zu Klumpen aggregiert.

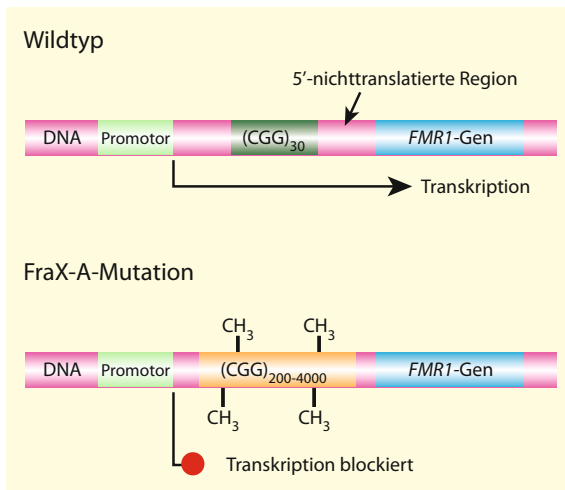
mikroskopisch erkennen kann. Die Tandem-repeats können bewirken, dass das Chromosom in zwei Teile zerbricht, oder die Region wird lediglich noch durch einen dünnen Faden Material zusammengehalten. Fragiles-X-Syndrom betrifft etwa einen von 4500 Männern und geht mit einer geistigen Retardierung einher. Bei Frauen tritt dieses Syndrom seltener auf und äußert sich weitaus weniger schlimm. Dieser Unterschied ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass Frauen zwei X-Chromosomen besitzen, Männer hingegen nur eines. Allerdings kommt auch noch ein unterschiedliches Imprinting hinzu (s. weiter unten).

Fragiles-X-Syndrom entsteht aufgrund von Tandem-repeats von CGG innerhalb der 5'-nicht-translatierten Region des *FMR1*-Gens in der Bande Xq27 des betroffenen X-Chromosoms (Abb. 16.5). In der Wildtypform finden sich ungefähr 30 Kopien von CGG. Wie bei den zuvor beschriebenen CAG-repeats ist auch hier die Anzahl der Wiederholungen instabil und zeigt die Tendenz, mit jeder Generation anzusteigen. Bei einem Anstieg auf 50 bis 200 Wiederholungen sind noch keine Symptome zu beobachten. Die Kinder solcher Träger weisen aber häufig mehr als 200 Wiederholungen

auf und zeigen Krankheitssymptome. Bei der vollen Ausdehnung kann das Allel für Fragiles-X-Syndrom bis zu 1300 CGG-Wiederholungen aufweisen. Diese CGG-repeats werden zwar nicht in Proteine translatiert, fungieren aber als CG-Inseln und sind zumeist methyliert. Das verhindert die Transkription des *FMR1*-Gens, das die Synthese von Proteinen in den synaptischen Verbindungen von Nervenzellen reguliert. Neben geistiger Retardierung hat dieser Defekt auch noch weitere Symptome zur Folge. Eine weitere Stelle für Fragiles X (als FraX-E bezeichnet) befindet sich im *FMR2*-Gen, rund 600 kb distal des *FMR1*-Gens (FraX-A).

Bestimmte Mutationen bestehen aus zahlreichen Tandem-repeats aus drei Basen (d.h. eines vollständigen Codons). Wie schwer sich diese Mutationen auswirken, hängt von der Zahl der Wiederholungen ab. Da diese meist mit jeder Generation zunimmt, spricht man von dynamischen Mutationen.

Störungen bei Imprinting und Methylierung



16.5 Fragiles X

Zwischen dem Promotor und dem Gen für *FMR1* befindet sich eine Abfolge von rund 30 CGG-repeats. Diese sind normalerweise im mRNA-Transkript vorhanden, werden aber nicht in Protein translatiert. Durch Fehler der DNA-Polymerase bei der Replikation steigt die Zahl dieser Wiederholungen. Treten mehr als 200 Wiederholungen auf, werden die CG-Sequenzen stark methyliert. Die RNA-Polymerase kann das Gen dann nicht transkribieren, und es wird kein Protein produziert.

Genetisches Imprinting (genetische Prägung) beruht auf den Auswirkungen der Methylierung auf die Genexpression. Im typischen Fall ist nur eine Kopie eines Gens methyliert, um seine Expression zu verhindern. Zum Imprinting kommt es, wenn die in den Gameten vorhandenen Methylierungsmuster überdauern und sich auf die Genexpression in dem neu entstehenden Organismus auswirken. Bei einigen wenigen Genen unterscheidet sich das Methylierungsmuster in den männlichen und weiblichen Gameten. Ob eine bestimmte Kopie eines Gens exprimiert wird, kann folglich davon abhängen, ob es von dem Vater oder von der Mutter geerbt wurde. Solche vererbten Veränderungen, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz zurückzuführen sind, bezeichnet man als **epigenetisch**.

Das **Prader-Willi-Syndrom** und das **Angelman-Syndrom** entstehen durch Defekte in benachbarten Genen auf Chromosom 15 an den Banden 15q11-q13, die der genetischen Prägung unterliegen. Die Herkunft dieser Region aus dem Spermium oder aus der Eizelle bestimmt ihr Methylierungsmuster und somit das Muster der Genexpression (Abb. 16.6). Etwa 75 % der Fälle von Prader-Willi-Syndrom und

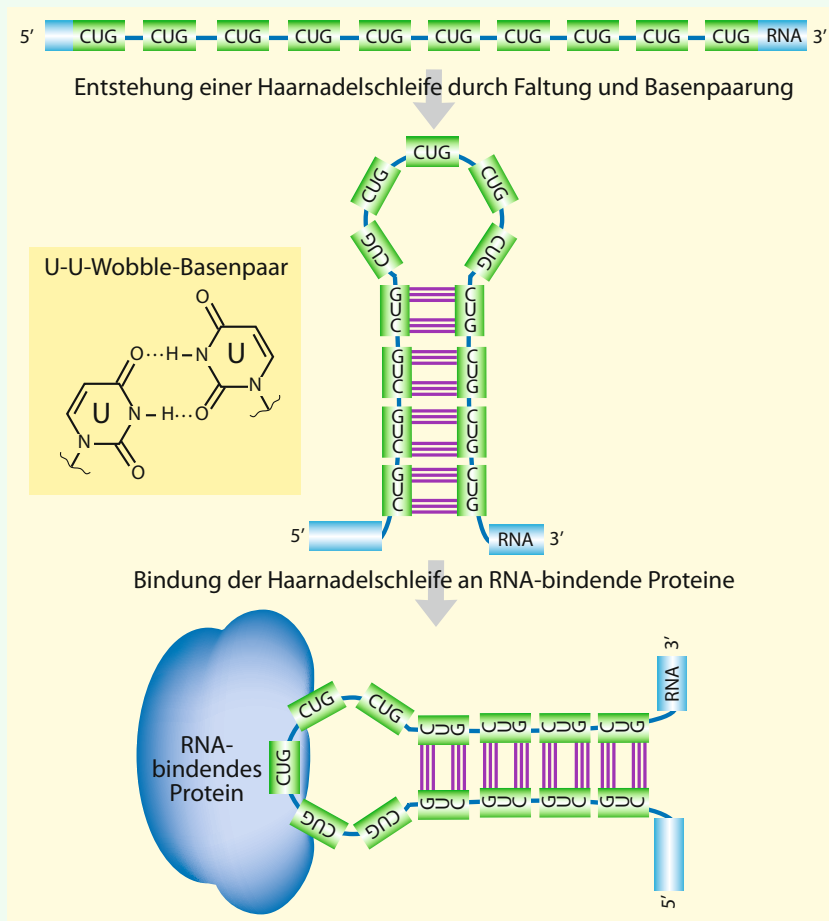
Exkurs 16.1

RNA-Funktionsgewinn in Tandem-repeats

Manche durch Triplettwiederholungen hervorgerufenen Krankheiten äußern sich in komplexen Symptomen, die sich nicht alleine durch Veränderungen der Proteinstruktur oder der Genexpression erklären lassen. Es scheint vielmehr, als würde ein verändertes RNA-Molekül, das die Triplettwiederholung trägt, sich direkt nachteilig auswirken. Man spricht bei dieser ungewöhnlichen Situation von „RNA-Funktionsgewinn“ (engl. *RNA gain of function*). Ein Beispiel hierfür ist die myotone Dystrophie, die durch eine instabile CTG-Wiederholung verursacht wird. Diese befindet sich in der 3'-nichttranslatierten Region des *DMPK*-Gens auf Chromosom 19q13. Die wiederholte Sequenz taucht zwar in der transkribierten RNA auf (als CUG-repeat), aber nicht im Proteinprodukt. Diese Wiederholung verhindert eine Prozessierung der mRNA und ihren Transport ins Cytoplasma. Die Folge ist ein Mangel an dem Protein DMPK (Dystrophia myotonica-Proteinkinase). Knockout-Mäuse mit defektem *DMPK*-

Gen zeigen jedoch nur einige der Symptome der myotonen Dystrophie.

Diese weiteren Symptome beruhen auf der direkten Wirkung der RNA, die den CUG-repeat beinhaltet (Abb.). In RNA bilden lange Abschnitte aus CUG-Tandem-repeats eine stabile Haarnadelschleife mit einem einzelnen langen Stil. Diese RNA bleibt im Zellkern und bindet dort an mehrere Proteine, vor allem an die durch doppelsträngige-RNA aktivierte Proteinkinase PKR. Dieses Enzym ist Bestandteil eines Abwehrsystems gegen Viren und wird durch Bindung an dsRNA aktiviert. Aktivierte PKR phosphoryliert mehrere Zielproteine, darunter auch den Translationsfaktor eIF2 α . Dadurch soll in von Viren infizierten Zellen die Proteinsynthese abgeschaltet werden. Infolge der Abscheidung weiterer Proteine, die Kern-RNA binden, und der Störung ihrer normalen Funktion bei Prozessierung und Spleißen der RNA treten noch eine Reihe weiterer nachteiliger Wirkungen auf.

**RNA-Funktionsgewinn**

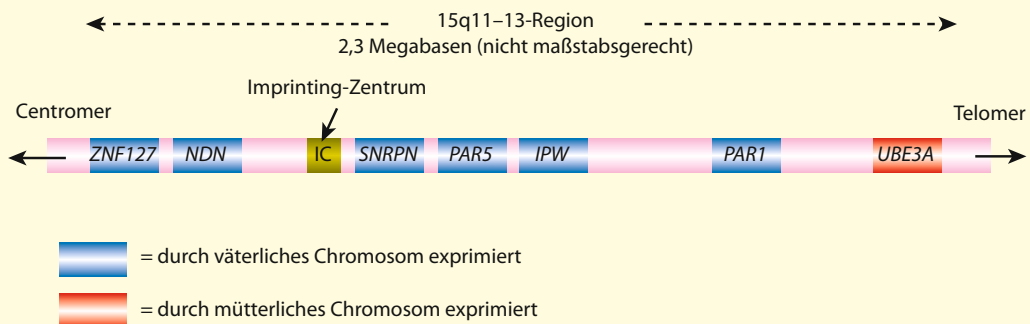
CUG-Tandem-repeats bilden in der RNA stabile Haarnadelschleifen, die feste Bindungen mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen eingehen können. An der Struktur sind nichtkanonische U-U-Basenpaare beteiligt (kleines Bild).

Angelman-Syndrom werden durch Deletionen verursacht. Seltener sind sie die Folge von Punktmutationen, von Fehlern beim Imprinting oder entstehen, weil beide Kopien von Chromosom 15 von einem Elternteil geerbt wurden. Das Prader-Willi-Syndrom entwickelt sich, wenn die väterliche Kopie von 15q11–q13 deletiert oder mutiert und die mütterliche Kopie dieser Region methyliert ist. Das Angelman-Syndrom beruht hingegen auf einem Funktionsverlust von Genen auf dem von der Mutter stammenden Chromosom und einer Methylierung des väterlichen Chromosoms. Durch diese Imprinting-Muster werden funktionsfähige Kopien dieser Gene abgeschaltet, was zu den entsprechenden Defekten führt. Beide

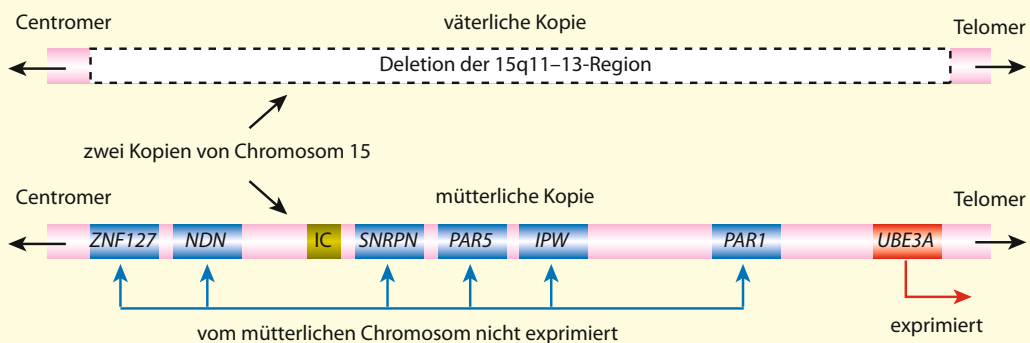
Syndrome gehen mit geistiger Retardierung einher, unterscheiden sich aber in anderen damit in Verbindung stehenden Symptomen. Das Prader-Willi-Syndrom ist beispielsweise durch starkes Übergewicht, das Angelman-Syndrom durch Wachstumsstörungen und Hyperaktivität gekennzeichnet.

Die Methylierungsmuster einiger weniger Gene unterscheiden sich, je nachdem, ob sie vom männlichen oder vom weiblichen Elternteil stammen. Wenn eine Kopie eines solchen Gens defekt oder durch Methylierung inaktiviert ist, können daraus komplexe Syndrome resultieren.

a die 15q11–13-Imprinting-Region



b Situation beim Prader-Willi-Syndrom



16.6 Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom

a Auf Chromosom 15 befindet sich zwischen 15q11 und 15q13 eine durch Imprinting geprägte Region. Das väterliche Chromosom exprimiert die blau unterlegten Gene und schaltet die rot unterlegten aufgrund von Imprinting ab. Im mütterlichen Chromosom werden die rot dargestellten Gene exprimiert und die blauen methyliert. Bei einem normalen diploiden Individuum wird jeweils eine einzelne Kopie jedes Gens – vom väterlichen oder mütterlichen Chromosom – exprimiert.

b Beim Prader-Willi-Syndrom ist die väterliche Kopie von Chromosom 15 zwischen Region 15q11 und 15q13 deletiert. Auf der anderen Kopie von Chromosom 15 sind diese Gene zwar (in blau dargestellt) vorhanden, aber aufgrund von Imprinting abgeschaltet. Sie verlieren ihre Funktion damit vollständig.

Mitochondriale Defekte

Das mitochondriale Genom macht nur einen Bruchteil der gesamten genetischen Information einer tierischen Zelle aus. Das Kerngenom des Menschen enthält nur etwa 100 mb codierende DNA, das Mitochondriengenom nur 15,4 kb codierende mitochondriale DNA (mtDNA). Insofern erfolgt die überwiegende Mehrzahl der Mutationen, die codierende DNA betreffen, in der Kern-DNA. Überdies enthalten die meisten Zellen Tausende von Kopien der mtDNA, sodass sich eine Mutation eines Gens bei einer der Kopien kaum auf den gesamten Organismus auswirkt. Da jede Mutation meist ihren Ursprung auf einem einzelnen mtDNA-Molekül hat, ist es höchst unwahrscheinlich, dass diese sich in der Mitochondrienpopulation ausbreitet und fixiert wird. Trotzdem betrifft ein überraschend hoher Anteil genetischer Störungen die mtDNA.

Das liegt unter anderem daran, dass mtDNA eine weitaus höhere Mutationsrate aufweist als Kern-DNA. In den Mitochondrien ereignen sich viel mehr Oxidationsschäden an der DNA, hervorgerufen durch reaktive Sauerstoffspezies, wie sie in der Atmungskette entstehen. Zudem gibt es in den Mitochondrien weniger Reparatursysteme, und die mtDNA ist nicht durch Histone geschützt. Weiterhin kann es passieren, dass Mitochondrien sehr viel mehr Zellteilungen durchlaufen als die Zellen, in denen sie sich befinden. (Die mtDNA von Tieren evolviert sehr schnell, bei Pflanzen herrscht jedoch eine ganz andere Situation. Pflanzliche mtDNA ist deutlich größer [150 kbp gegenüber 2,5 Mbp], enthält Introns und evolviert relativ langsam.)

Spermienzellen steuern im Rahmen der Befruchtung Kern-DNA zur Zygote bei, aber nicht ihre mtDNA. Folglich stammen sämtliche Mitochondrien eines Individuums von einem Vorfahren der weiblichen Eizelle oder **Oocyte**, die ungefähr 100 000 Kopien der mtDNA enthält. Trotzdem liegt die Mutationsrate der mtDNA etwa zehnmal höher als die der Kern-DNA. Offensichtlich gibt es bei der Replikation der mtDNA einen Flaschenhals. Bei der Entwicklung der primordialen Keimzellen zu Oocyten teilen sich nur wenige ihrer Mitochondrien und bringen Nachkommen hervor (Abb. 16.7). Dadurch können sich Mutationen in der Mitochondrienpopulation einer bestimmten Zelllinie ausbreiten.

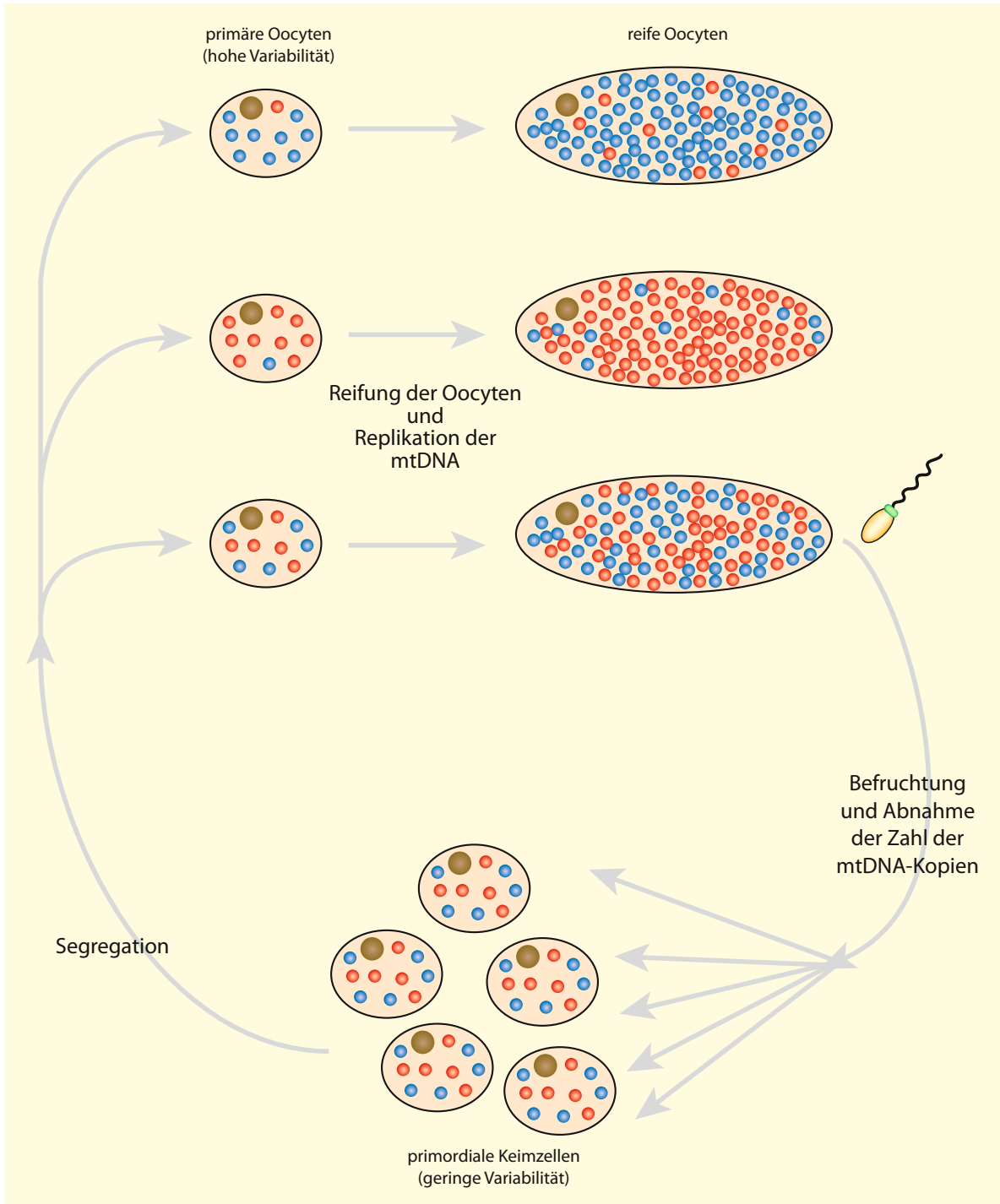
Genetische Störungen, die auf Mutationen in den Mitochondrien beruhen, werden über die mütterliche Linie vererbt. Weist die gesamte Population der Mitochondrien einer einzelnen Zelle die Mutation

auf, so spricht man von **Homoplasmie**; enthält die Zelle sowohl mutierte als auch normale Mitochondrien, nennt man dies **Heteroplasmie**. Wie schwer der Defekt ist, hängt teilweise vom proportionalen Anteil defekter Mitochondrien ab, der bei Individuen mit der gleichen Mutation variieren kann.

Mitochondrien sind in hohem Maße darauf spezialisiert, durch Atmung Energie zu erzeugen; daher beeinflusst eine Mehrzahl der mitochondrialen Gene die Atmungskette (Abb. 16.8). Infolgedessen wirken sich fast alle genetischen Defekte der mtDNA auf die Zellatmung aus und führen zu einer geringeren Energieproduktion. Aufgrund des unterschiedlichen Energiebedarfs verschiedener Gewebe haben Defekte der Mitochondrien auch unterschiedlich starke Auswirkungen auf diese Gewebe. Besonders anfällig sind wegen ihres hohen Energieverbrauchs Gehirn und Muskulatur.

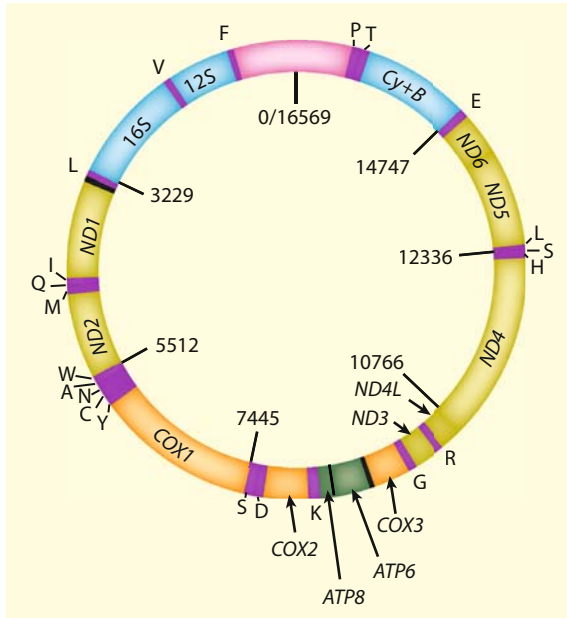
Das durch Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa gekennzeichnete NARP-Syndrom beruht auf Veränderungen an Position 8993 des mtDNA-Moleküls. Sie betreffen das *ATP6*-Gen, das für einen Bestandteil der **ATP-Synthase** codiert. Dieses Enzym koppelt normalerweise Energie von der Atmungskette an die Synthese von ATP. Die Mutation führt zu einem Mangel an ATP als Energiequelle für die Zelle. Am stärksten betroffen sind Nerven- und Muskelzellen. Die Störung äußert sich beispielsweise in Form von Muskelschwäche, Demenz, Lähmungen und gestörten Sinneswahrnehmungen. Die Symptome treten auf, wenn 70–90 % der Mitochondrien von der Mutation betroffen sind. Bei einer Rate von mehr als 90 % sterben die Betroffenen in der Regel bereits im Kindesalter.

Das MERRF-Syndrom, eine mitochondriale Myopathie, die durch myoklonische Epilepsie und zottige rote Fasern (engl. *ragged red fibers*, RRF) charakterisiert ist, entsteht aufgrund eines Defekts des mitochondrialen Gens für Lysin-tRNA. In den meisten Fällen liegt die Punktmutation A8344G (A zu G an Position 8344 des mtDNA-Moleküls) zugrunde. Die defekte tRNA hat zur Folge, dass weniger mitochondriale Proteine synthetisiert werden und dadurch die Atmung verringert ist. Dies führt zu zeitweiligen Lähmungen, mangelhafter Muskelkoordination und dem Verlust von Muskelzellen. Die Bezeichnung RRF beziehungsweise *zottige rote Fasern* bezieht sich auf Klumpen defekter Mitochondrien, die in Muskelzellen aggregieren und ursprünglich durch einen roten Farbstoff sichtbar gemacht wurden. Die Symptome treten auf, wenn mindestens 90 % der Mitochondrien in Nerven- und Muskelzellen betroffen sind.



16.7 Der Flaschenhals der mitochondrialen DNA

In primordialen Keimzellen (unten) tritt bei rund 50 % der Mitochondrien eine Mutation (rot) auf. Bei der Entwicklung zu primären Oocyten werden nur wenige Mitochondrien weitergegeben. Daher enthalten einige Oocyten nur wenige betroffene Mitochondrien (Oocyte ganz oben), einige überwiegend defekte Mitochondrien (Mitte) und andere etwa gleich hohe Anteile von beiden (unten). Wenn sich die primären Oocyten zu reifen Eizellen entwickeln, steigt die Zahl der Mitochondrien an, aber das Verhältnis von mutierten zu normalen bleibt in jeder Zelllinie gleich.



16.8 Karte der mitochondrialen DNA des Menschen

Die Gene der mitochondrialen DNA codieren für tRNA, rRNA und Proteine, die der Energiegewinnung dienen. Die tRNA-Gene sind durch die Einzelbuchstabensymbole für Aminosäuren gekennzeichnet. Die beiden rRNA-Gene sind 16S und 12S. Die übrigen Gene codieren jeweils für Proteine in den Komplexen I, III, IV und V der Atmungskette.

Mutationen im mitochondrialen Genom führen ebenfalls zu genetischen Störungen, die meist die Erzeugung von Energie betreffen. Im Gegensatz zu Mutationen der Kerngene werden Mutationen in den Mitochondrien ausschließlich über die mütterliche Linie vererbt.

Identifizieren, Lokalisieren und Klonieren defekter Gene

Die Natur von Mutationen sowie Techniken zu deren Analyse, wurden bereits in den vorherigen Kapiteln behandelt. Mittlerweile wurde das menschliche Genom vollständig sequenziert. Deshalb steht prinzipiell für alle Gene, welche die beobachteten genetischen Störungen hervorrufen, die DNA-Sequenz zur Verfügung. In der Praxis erweist es sich jedoch nicht immer als so einfach, bestimmte Symptome mit einem spezifischen Gen in Zusammenhang zu bringen. Hier

sollen nun einige der allgemeinen Methoden skizziert werden, mit denen man die für Erbdefekte verantwortlichen Gene identifiziert und ihre Position auf den menschlichen Chromosomen ermittelt. Um die Identität eines Gens zu bestätigen, wird dieses normalerweise zunächst kloniert und danach weiter genetisch analysiert. Nach dieser allgemeinen Einführung werden dann noch zwei Beispiele im Detail betrachtet: cystische Fibrose und Duchenne-Muskeldystrophie.

Um herauszufinden, welche Gene eine genetische Störung hervorrufen, analysiert man zunächst die Symptome und erstellt daraufhin eine Hypothese, welche Proteine wahrscheinlich daran beteiligt sind. Dann wählt man aus der Liste der charakterisierten Gene mögliche Kandidatengene aus und unterzieht diese weiteren Analysen. Daher spricht man bisweilen auch von der **Klonierung von Kandidatengenen** (engl. *candidate cloning*). Weil bislang nur relativ wenige menschliche Gene charakterisiert wurden, ist diese Methode nur selten erfolgreich. Durch die starke Ausweitung der Forschungen auf den Gebieten der Genomik und Proteomik in jüngster Zeit werden jedoch immer mehr Funktionen von Säugetiergenen entschlüsselt, sodass sich diese Methode in der nahen Zukunft noch als sehr wertvoll erweisen könnte.

Durch die Verwendung von Modellorganismen, insbesondere von Mäusen, kann die Methode verbessert werden. Für die überwiegende Mehrzahl der menschlichen Gene gibt es homologe Gene bei Mäusen. Im Gegensatz zu Menschen kann man an Mäusen jedoch direkt genetische Versuche durchführen. Wie bereits in Kapitel 15 beschrieben, kann man Mäuse erzeugen, bei denen beide Kopien eines ausgewählten Gens künstlich inaktiviert wurden. Solche **Knockout-Mäuse** kann man dann auf Symptome untersuchen. Derzeit sind einige umfangreiche Programme im Gang, systematisch Mäuse mit Knockout-Mutationen zu erzeugen, die jedes einzelne der rund 25 000 Gene von Säugetieren betreffen. Anhand der dadurch gewonnenen Informationen sollte es möglich sein, auch die Gene des Menschen mit bestimmten Symptomen in Verbindung zu bringen.

Die **funktionelle Klonierung** (engl. *functional cloning*) geht von einem bekannten Protein aus, von dem man annimmt, dass es an einer genetischen Störung beteiligt ist. Zunächst wird die Aminosäuresequenz des Proteins ermittelt. Heute erfolgt dies mit ziemlicher Sicherheit durch Massenspektrometrie von Peptidfragmenten, die durch Proteaseverdau des Proteins erzeugt wurden. Anschließend leitet man von der Proteinsequenz die codierende Sequenz des Gens ab und synthetisiert eine Oligonucleotidsonde. Mithilfe

dieser Sonde kann man dann durch Hybridisierung eine cDNA-Bibliothek überprüfen (s. Kap. 3). Eine Alternative hierzu ist, die Sonde an einen festen Träger zu koppeln, um damit ein spezifisches mRNA-Molekül aus einem Pool zellulärer mRNA herauszufischen. In letzterem Fall wird aus der gereinigten mRNA eine einzelne spezifische cDNA erzeugt. Die vollständige cDNA wird dann sequenziert, um zu bestätigen, dass die DNA mit dem Originalprotein übereinstimmt.

Anschließend muss das Gen in einer spezifischen Region auf einem bestimmten Chromosom lokalisiert werden. Das kann durch Radiation-hybrid-mapping oder durch Hybridisieren mittels einer DNA-Sonde mit einem Fluoreszenzmarker (z.B. durch FISH, s. Kap. 3) erfolgen. Die klonierte DNA aus der Zielregion wird dann – eingebaut in einen Vektor, der große Inserts aufnehmen kann, wie ein Cosmid oder YAC – einem Screening unterzogen, um die Position stärker einzuengen.

Ist die Natur des Genprodukts unbekannt, führt man eine **Positionsklonierung** (engl. *positional cloning*) durch. In diesem Fall muss man das Gen für die Erkrankung zumindest näherungsweise durch eine genetische Methode kartieren, bevor man weitere Analysen auf DNA-Basis durchführen kann. Am einfachsten sind Fälle mit einer größeren, lichtmikroskopisch erkennbaren Chromosomenanomalie wie einer Deletion, Inversion oder Translokation. Dadurch lässt sich der Defekt einer spezifischen Bande eines bestimmten Chromosoms zuordnen. Ansonsten kann man das schadhafte Gen durch Kopplungsanalysen an Individuen von Familien, die von der genetischen Störung betroffen sind, in der Nähe anderer genetischer Marker lokalisieren. Diese anderen Marker können bekannte Gene sein, meist handelt es sich jedoch um RFLPs, VNTRs oder andere Sequenzpolymorphismen.

Durch eine solche genetische Kartierung kann man ein Gen auf rund 1000 kb genau lokalisieren. Ein solcher DNA-Abschnitt kann zwischen zehn und 50 Gene enthalten, je nach Gendichte in diesem Bereich des Genoms. Danach wird die DNA aus der vermuteten Region, wie zuvor für die funktionelle Klonierung beschrieben, kloniert. Im Fall der Positionsklonierung liegt jedoch kein zuvor identifiziertes Protein vor, anhand dessen man auf das korrespondierende Gen hin analysieren kann. Deshalb muss die genetische Störung auf der Ebene der DNA identifiziert werden. Die verdächtige DNA kann man dann mit verschiedenen Methoden auf das Vorhandensein funktioneller Gene überprüfen:

1. Das Vorhandensein eines offenen Leserasters deutet auf eine potenzielle codierende Sequenz hin.

Hierbei ist zu beachten, dass bei höheren Organismen die codierenden Sequenzen normalerweise in mehrere Exons fragmentiert sind, die durch nichtcodierende Introns unterbrochen sind. Diese Introns können sehr lang sein und haben häufig einen größeren Anteil an der Gesamtlänge des Gens als die Exons.

2. In der DNA von Wirbeltieren finden sich strangaufwärts der transkribierten Regionen häufig CpG-(oder CG-)Inseln. Das sind GC-reiche Abschnitte, die aus regulatorischen Gründen zumeist methyliert vorliegen. Erkennen kann man sie am Vorhandensein mehrerer Schnittstellen für Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenzen ausschließlich aus C und G bestehen (z.B. schneidet *HpaII* an C/CGG).
3. Codierende DNA evolviert tendenziell langsamer als nichtcodierende DNA. Folglich hybridisiert die codierende DNA eines Tieres häufig mit DNA von verwandten Organismen, während das bei nichtcodierender DNA nicht der Fall ist. Zur Identifikation der codierenden DNA wird oft ein sogenannter Zoo-blot durchgeführt.
4. Aus den am stärksten von einer Erbkrankheit betroffenen Geweben extrahierte mRNA sollte signifikante Mengen mRNA enthalten, die von dem Verursacher gen stammt. Anhand der Hybridisierung kann man feststellen, ob die DNA-Sequenzen der Kandidatengene mit denen im mRNA-Pool übereinstimmen. (Davon ausgehend, dass das fragliche Gen in entsprechend hoher Menge exprimiert wird. Das gilt im Allgemeinen für Gene, die für Strukturproteine und Enzyme codieren, aber nicht für solche, die für regulatorische Proteine codieren. Man sollte hierbei auch beachten, mRNA von einer gesunden Person zu isolieren, weil das Gen bei Patienten, die unter der Störung leiden, möglicherweise nicht transkribiert wird.)
5. Schließlich sollten sich bei der Sequenzierung von DNA aus gesunden und betroffenen Individuen Unterschiede ergeben – sofern das verdächtige Gen tatsächlich für die genetische Störung verantwortlich ist.

Zur Klonierung von Genen, die genetische Störungen beim Menschen verursachen, werden verschiedene Methoden angewandt. Einige beruhen darauf, dass die Position des Gens bekannt ist, andere auf der Funktion des Gens. Informationen von Modellorganismen mit entsprechenden Defekten haben sich häufig als sehr hilfreich erwiesen.

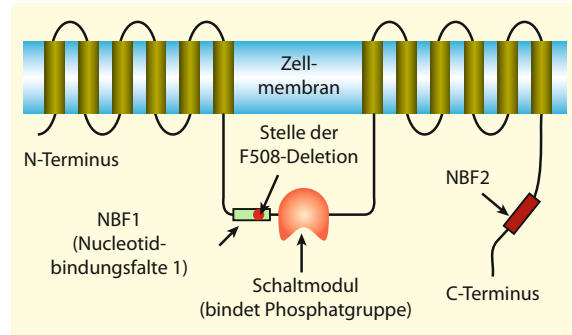
Cystische Fibrose

Etwa eines von 2000 weißen Kindern leidet unter **cystischer Fibrose**. Diese auch als **Mucoviscidose** bekannte Erkrankung geht auf eine homozygot-rezessive Mutation zurück. Mit anderen Worten, ein Kind leidet dann an der Krankheit, wenn es von jedem Elternteil jeweils eine defekte Kopie des Gens geerbt hat. Individuen mit einem einzelnen defekten Allel sind Träger, zeigen aber keine Symptome, denn eine einzelne Wildtypversion des Gens reicht für eine normale Gesundheit aus.

Das von dem Gen für cystische Fibrose codierte Protein wird als **CFTR-Protein** (für engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) bezeichnet und fungiert in der Zellmembran als Kanal für Chloridionen. Bei gesunden Menschen kann dieser Kanal nach Bedarf der Zelle geöffnet oder geschlossen werden. Das CFTR-Protein besteht aus einer Reihe Membran-durchspannender Untereinheiten mit einem zentralen Kontrollmodul (Abb. 16.9). Ist an das Kontrollmodul eine Phosphatgruppe gebunden, so ist der Kanal offen; nach Entfernen der Phosphatgruppe schließt er sich.

Bei Patienten mit cystischer Fibrose ist die Steuerung des Chloridkanals defekt. Dies wirkt sich wiederum auf eine Reihe weiterer Prozesse aus. Am schlimmsten ist die abnorme Zähflüssigkeit des Schleimes, der die Lungen auskleidet und schützt. Aufgrund des Mangels an Chloridionen enthält der Schleim einen geringeren Wasseranteil. Dadurch verstopfen die Bronchien, und auf dem Schleim können sich schädliche Mikroorganismen ansiedeln. Die Epithelzellen der Luftwege sterben ab und werden durch fibröses Narbengewebe ersetzt, daher der Name der Krankheit. Der Patient leidet schließlich unter akuter Atemnot.

Die generelle Position des Gens für cystische Fibrose (innerhalb von zwei Millionen Basenpaaren) stellte man durch Screening einer großen Zahl genetischer Marker (RFLPs) bei Familienmitgliedern von betroffenen Patienten fest. Man fand das Gen auf dem langen Arm (q) von Chromosom 7 zwischen den Banden q21 und q31. Durch Subklonierung dieser Region des Chromosoms in großen Abschnitten fand man heraus, dass das Gen für cystische Fibrose 250 000 Basenpaare und 24 Exons umfasst und für ein Protein aus 1480 Aminosäuren codiert (Abb. 16.10). Da für die Codierung von 1480 Aminosäuren lediglich 4440 Basenpaare erforderlich sind, bestehen nur knapp 2 % des Gens für



16.9 Das CFTR-Protein transportiert Chloridionen

Das CFTR-Protein besteht aus zwölf hydrophoben Untereinheiten, welche die Zellmembran durchspannen. Verbunden sind diese zwölf Abschnitte über kleine Schleifen, mit Ausnahme der Abschnitte 6 und 7: Diese sind über eine große Proteinschleife verbunden. In der dreidimensionalen Konfiguration bilden die zwölf Transmembranabschnitte zusammen einen Kanal, und die große Proteinschleife reguliert, ob er Kanal geöffnet oder geschlossen ist.

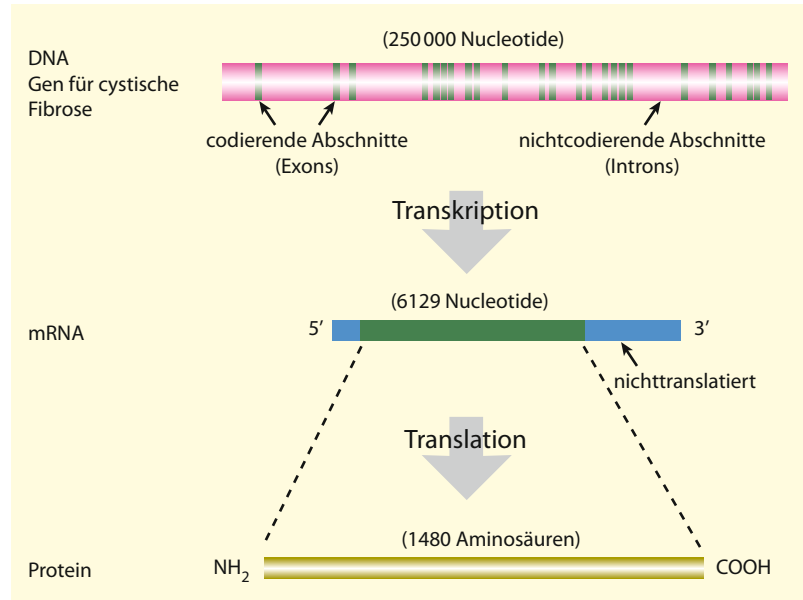
cystische Fibrose aus codierender DNA, den Rest bilden Introns.

In Nordamerika weisen ungefähr 70 % der von cystischer Fibrose Betroffenen den gleichen Gendefekt auf. Sie alle haben eine kleine Deletion von drei Basen, die für die Aminosäure Phenylalanin an Position 508 des normalen Proteins codieren. In Dänemark sind 90 % der Fälle von cystischer Fibrose auf diese $\Delta F508$ -Deletion zurückzuführen (F steht im Einbuchstabencode für Phenylalanin), in Mittelasien dagegen lediglich 30 %. Die anderen Fälle von cystischer Fibrose beruhen auf mehr als 500 verschiedenen Mutationen, die genetische Untersuchungen sehr erschweren.

Die Verbreitung und die relative hohe Häufigkeit der $\Delta F508$ -Deletion legen nahe, dass sie vor vielleicht 2000 Jahren in Westeuropa entstanden sein muss und einer positiven Selektion unterlag. Zwei defekte Kopien des *CFTR*-Gens wirken sich extrem nachteilig aus, Heterozygote mit einem $\Delta F508$ -Allel und einem normalen Allel zeigen nur eine mäßige Verringerung von Ionenfluss und Wassertransport. Dadurch entsteht zwar keine cystische Fibrose, aber es reicht aus, dass bei Diarrhö ein signifikanter Flüssigkeitsverlust auftritt. Solche Heterozygoten sind resistenter gegenüber den Auswirkungen von Darminfektionen wie Typhus und Cholera, die wegen der ausgeprägten Diarrhö zur Austrocknung führen.

16.10 Das Gen für cystische Fibrose

Das Gen für cystische Fibrose erstreckt sich über einen extrem großen DNA-Bereich (250 000 Nucleotide) und enthält 24 Exons. Nach Transkription und Spleißen umfasst die mRNA nur noch 6129 Nucleotide, zum größten Teil besteht das Gen also aus Introns.

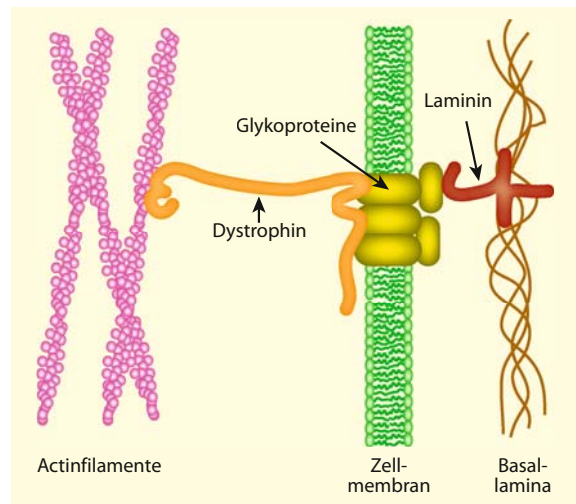


Der primäre Defekt bei cystischer Fibrose betrifft ein Transportprotein für Chloridionen. Als Sekundäreffekt sammelt sich in den Lungen zähflüssiger Schleim an, der den Nährboden für bakterielle Infektionen bildet. Heterozygote mit nur einem defekten *CFTR*-Gen zeigen eine Resistenz gegen Infektionskrankheiten, die zur Austrocknung führen.

Muskeldystrophie

Es gibt mehrere Formen von **Muskeldystrophien**. Bei diesen Erkrankungen kommt es zu einem Schwund des Muskelgewebes, der einen frühen Tod zur Folge hat, meist im Alter von rund 20 Jahren. Eine Heilungsmöglichkeit ist nicht bekannt. Die häufigste Form, die **Duchenne-Muskeldystrophie**, beruht auf Defekten des Proteins **Dystrophin**. Dieses spielt eine Rolle bei der Bindung der kontraktilen Filamente an die Membranen von Muskelzellen (Abb. 16.11).

Das für diese Krankheit verantwortliche **DMD-Gen** ist geschlechtsgebunden und findet sich auf der Bande Xp21 in der Nähe des kurzen Armes (p) des X-Chromosoms (Abb. 16.12). Weil das Y-Chromosom kürzer ist als das X-Chromosom, gibt es für viele Gene, die auf dem X-Chromosom liegen, keine entsprechenden Gegenstücke auf dem Y-Chromosom.

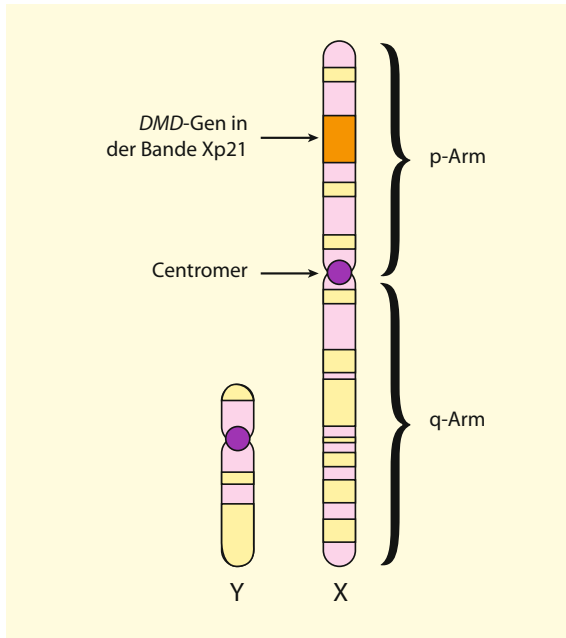


16.11 Dystrophin bindet Actin an die Zellmembran

Das Protein Dystrophin verankert die langen Actinfilamente über Glykoproteinwechselwirkungen an der Membran der Muskelzellen. Die gleichen Glykoproteine verankern die Zellmembran an der Basallamina in den extrazellulären Bereichen.

Daher besitzt das weibliche Geschlecht zwei Kopien des **DMD**-Gens, das männliche hingegen nur eine.

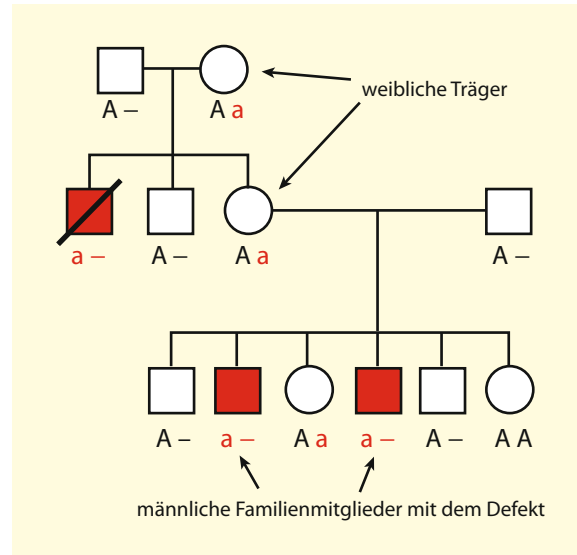
Ist die einzige im männlichen Geschlecht vorhandene Kopie eines geschlechtsgebundenen Gens defekt, so kann dies nicht durch eine entsprechende



16.12 Das DMD-Gen ist geschlechtsgebunden
DMD liegt auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms. Weil Männer nur ein X-Chromosom besitzen, ist nur das männliche Geschlecht von Duchenne-Muskeldystrophie betroffen.

zweite Kopie ausgeglichen werden, und es kommt zu schweren Symptomen. Bei nur einer defekten Kopie im weiblichen Geschlecht treten gewöhnlich keine Symptome auf, aber solche Frauen sind Träger. Die Hälfte der männlichen Nachkommen dieser Frauen werden die Krankheit bekommen. Dadurch ergibt sich ein Vererbungsmuster, bei dem ausschließlich die männlichen Familienmitglieder unter der Krankheit leiden. Abbildung 16.13 zeigt einen Familienstammbaum, bei dem mehrere Vertreter eine X-gebundene rezessive Krankheit tragen. Im Schnitt erben zwei Drittel der Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie die Krankheit von ihren Müttern, das andere Drittel erkrankt infolge von Neumutationen; diese entstehen mit einer Häufigkeit von etwa 1:10 000 Gameten.

Das *DMD*-Gen ist sogar noch eigenartiger als das Gen für cystische Fibrose. Es macht etwa 1,5 % der gesamten Länge des X-Chromosoms aus und ist länger als das gesamte Genom einiger Bakterien. Es enthält ungefähr 75 Exons und mehr als zwei Millionen Basenpaare, von denen weniger als 1 % tatsächlich für das Protein codieren. Trotzdem handelt es sich bei dem codierten Protein Dystrophin um ein gigantisches Protein. Es besteht aus 4000 Aminosäu-



16.13 X-gebundene rezessive Krankheit in einer Familie

Das Gen „A“ liegt auf dem X-Chromosom. Im männlichen Geschlecht ist nur ein X-Chromosom vorhanden, auf dem Y-Chromosom liegt keine entsprechende Kopie des Gens (symbolisiert durch „-“). Daher wird jedes männliche Familienmitglied, das eine Kopie des defekten Allels („a“) erhält, die Krankheit bekommen.

ren und ist damit ungefähr zehnmal so groß wie ein durchschnittliches Protein. Solche riesigen codierenden Sequenzen stellen größere Ziele für nachteilige Mutationen dar. Das erklärt, warum die Mutationsrate für das *DMD*-Gen mehr als zehnmal höher ist als die typischer menschlicher Gene. Bei den meisten Betroffenen ist der Defekt auf Änderungen in nur einem oder einigen wenigen Basen des *DMD*-Gens zurückzuführen. Rund 10 % der Betroffenen weisen jedoch eine Deletion auf, die das gesamte oder einen großen Teil des *DMD*-Gens umfasst.

Bei einem Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie war die Deletion groß genug, dass man sie mit dem Lichtmikroskop in der Region Xp21 des X-Chromosoms lokalisieren konnte. Mithilfe der Methode der subtraktiven Hybridisierung klonierte man mit der DNA dieses Patienten die DNA, die bei dieser Deletion fehlte. Bei dieser Methode ist das zu klonierende *DMD*-Gen in der DNA einer gesunden Person vorhanden. Die DNA-Probe mit der *DMD*-Deletion dient dazu, andere, unerwünschte Gene der gesunden DNA durch Hybridisierung zu entfernen. Zurück bleibt die gesunde Kopie des *DMD*-Gens, die dann zur weiteren Analyse auf einen Vektor kloniert

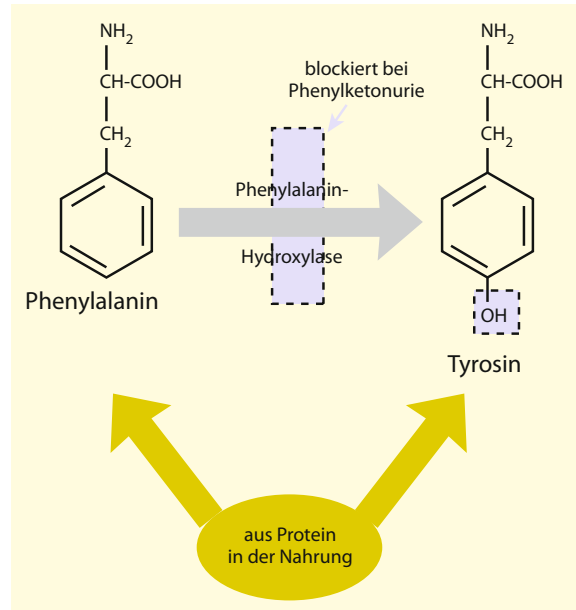
wird. (Für Details zur Klonierung durch subtraktive Hybridisierung s. Kap. 3).

Es sind mehrere Typen erblicher Muskeldystrophien bekannt und recht gut auf genetischer Ebene charakterisiert.

Genetische Analysen und Beratung

Wie bereits erläutert, ist das Risiko, Kinder mit genetischen Störungen zu bekommen, bei Ehen naher Verwandter erhöht, weil hierbei nachteilige rezessive Allele zusammenkommen können. In ähnlicher Weise gilt, dass zwei Menschen aus nicht miteinander verwandten Familien, in denen aber jeweils die gleiche Erbkrankheit aufgetreten ist, besser darauf verzichten sollten, miteinander Kinder zu bekommen. Mittlerweile kann man jedoch mehr als nur allgemeine Ratschläge erteilen. Für eine zunehmende Zahl an Genen können angehende Eltern nun auf genetische Erkrankungen mit hohem Risiko überprüft werden. Typischerweise erfolgt dies mittels einer Hybridisierungs-sonde (s. Kap. 3) oder PCR-Analyse (s. Kap. 4). Dadurch lässt sich feststellen, ob in einer DNA-Probe der Testperson eine mutierte Kopie des Gens vorhanden ist. Werden Ehepartner beide positiv auf eine rezessive Störung getestet, dann müssen sie selbst entscheiden, ob sie das Risiko eingehen wollen, Kinder zu bekommen, oder nicht. Wenn bei einer rezessiven Erkrankung beide Eltern Träger sind, wird eines von vier Kindern die Krankheit haben.

Bei den genetischen Analysen gibt es ein grundlegendes Problem: Die Fähigkeiten, genetische Störungen festzustellen, sind bei weitem fortschrittlicher als die Möglichkeiten, diese zu heilen. So kann eine solche Analyse eine Störung aufzeigen, gegen die man noch nichts tun kann. Das kann für die Betroffenen eine hohe psychische Belastung bedeuten. Die autosomal dominante Erkrankung Chorea Huntington geht beispielsweise mit Bewegungsstörungen und Demenz einher und verläuft schließlich tödlich. Die Symptome treten normalerweise ab einem Alter von etwa 30 Jahren auf, bei manchen Patienten aber auch erst im Alter von über 60. Genetische Analysen können den Betroffenen helfen zu entscheiden, ob sie Kinder bekommen möchten. Sie erfahren dadurch aber auch, dass sie selbst irgendwann eine unheil-



16.14 Phenylketonurie

Phenylalanin-Hydroxylase katalysiert die Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin. Bei Fehlen dieses Enzyms reichert sich Phenylalanin an und wirkt toxisch auf das Nervensystem.

bare, tödliche Krankheit bekommen werden. Auch einige Formen von Krebs und koronare Herzerkrankungen haben eine genetische Komponente (oft sind sie multigen). Die Analysen können die Betroffenen veranlassen, krankheitsauslösende Faktoren zu meiden. Andererseits kann ein solches Wissen aber auch zur Belastung werden, wenn die Behandlung kompliziert und/oder nur teilweise von Erfolg gekrönt ist.

Bisweilen ermöglichen genetische Analysen ein erfolgreiches Eingreifen in den Krankheitsverlauf, durch eine Veränderung der Ernährung oder der Lebensweise. Der klassische Fall ist die **Phenylketonurie**. Hierbei bewirkt das Fehlen des Enzyms **Phenylalanin-Hydroxylase**, dass sich Phenylalanin anreichert und ein Mangel an dem Produkt Tyrosin herrscht (Abb. 16.14). Überschüssiges Phenylalanin wirkt als Nervengift. Unbehandelt führt diese Krankheit zu schweren Schädigungen des Zentralnervensystems, und die Patienten werden lebenslange Pflegefälle. Durch eine Phenylalanin-arme Ernährung kann man jedoch eine Anreicherung dieser Aminosäure vermeiden und diese Probleme weitgehend entschärfen. Phenylketonurie tritt mit einer Häufigkeit von 1:10 000 Lebendgeburten auf. In Industrie-

nationen werden innerhalb der ersten Lebenswoche anhand von Blutproben Routinetests auf diese Erkrankung durchgeführt. Im späteren Leben, wenn die Entwicklung des Nervensystems weitgehend abgeschlossen ist, können die strikten Einschränkungen der Ernährung etwas gelockert werden.

Wenn ein verlässlicher Test verfügbar ist, herrscht im Allgemeinen Übereinstimmung, dass ein Screening von Neugeborenen gerechtfertigt ist, sofern die Krankheit ausreichend häufig vorkommt (etwa 1:10 000 und häufiger), schlimme Schädigungen verursacht und eine Behandlung möglich ist, durch die sich die Erkrankung deutlich lindern lässt.

Man kann auch schon Embryonen in frühen Stadien der Schwangerschaft testen. Dazu werden Proben des Fruchtwassers (der Amnionflüssigkeit) entnommen, das auch einige Zellen des Fetus enthält. Diese Fruchtwasseruntersuchung nennt man **Amniocentese**. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, extraembryonales fetales Gewebe zu untersuchen. Bei einer genetischen Analyse dieser Zellen kann man beispielsweise feststellen, ob der Fetus homozygot für eine rezessive Erkrankung ist. Embryonen mit Erbkrankheiten können dann abgetrieben werden, wenn die Eltern das möchten. Heute werden auch durch künstliche Befruchtung erzeugte Embryonen genetisch untersucht, bevor man sie implantiert. Dadurch wird ein Abort vermieden, sollte sich ein schlimmer Gendefekt herausstellen.

Für eine große und stetig wachsende Zahl von Erbkrankheiten stehen heute genetische Analysen zur Verfügung. Leider sind die meisten genetischen Störungen bislang noch nicht heilbar.

► Weiterführende Literatur

- Antonarakis SE, Epstein CJ (2006) The challenge of Down syndrome. *Trends Mol Med* 12: 473–479
- Butland SL, Devon RS, Huang Y, Mead CL, Meynert AM, Neal SJ, Lee SS, Wilkinson A, Yang GS, Yuen MM, Hayden MR, Holt RA, Leavitt BR, Ouellette BF (2007) CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome. *BMC Genomics* 8: 126
- Edwards CA, Ferguson-Smith AC (2007) Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol* 19: 281–289
- Feinberg AP (2007) Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447: 433–440
- Gadsby DC, Vergani P, Csanády L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440: 477–483
- Green NS, Dolan SM, Murray TH (2006) Newborn screening: Complexities in universal genetic testing. *Am J Public Health* 96: 1955–1959
- Hore TA, Rapkins RW, Graves JA (2007) Construction and evolution of imprinted loci in mammals. *Trends Genet* 23: 440–448
- Jirtle RL, Skinner MK (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 8: 253–262
- Krokan HE, Kavli B, Slupphaug G (2004) Novel aspects of macromolecular repair and relationship to human disease. *J Mol Med* 82: 280–297
- Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20: 146–154
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2007) Dynamic mutations as digital genetic modulators of brain development function and dysfunction. *Bioessays* 29: 525–535
- Ollero M, Brouillard F, Edelman A (2006) Cystic fibrosis enters the proteomics scene: New answers to old questions. *Proteomics* 6: 4084–4099
- Orr HT, Zoghbi HY (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 30: 575–621
- Paul S (2007) Polyglutamine-mediated neurodegeneration: Use of chaperones as prevention strategy. *Biochemistry (Moscow)* 72: 359–366
- Ranum LP, Cooper TA (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci* 29: 259–277
- Ranum LP, Day JW (2004) Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* 74: 793–804
- Reik W (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447: 425–432
- Sangiulio F, D'Apice MR, Gambardella S, Di Daniele N, Novelli G (2004) Toward the pharmacogenomics of cystic fibrosis – an update. *Pharmacogenomics* 5: 861–878
- Taylor RW (2005) Gene therapy for the treatment of mitochondrial DNA disorders. *Expert Opin Biol Ther* 5: 183–194

Gentherapie

Gentherapie oder Gentechnik?

Grundlegende Prinzipien der Gentherapie

Reparatur von Genen durch Crossing-over mit Oligonucleotiden

Aggressive Gentherapie

Adenoviren als Vektoren für die Gentherapie

Gentherapie mit Adenoviren bei cystischer Fibrose

Adeno-assoziierte Viren

Gentherapie mit Retroviren

Gentherapie mit Retroviren bei SCID

Nichtvirale Gentherapie

Liposomen und Lipofektion in der Gentherapie

Aggressive Gentherapie gegen Krebs

Antisense-RNA und andere Oligonucleotide

Aptamere – Blockieren von Proteinen mit RNA

Ribozyme in der Gentherapie

Weiterführende Literatur

Gentherapie oder Gentechnik?

Durch gentechnische Eingriffe wird ein Organismus dauerhaft verändert, sodass er diese Veränderungen stabil weitervererbt. Bei vielzelligen Organismen setzt dies die bewusste Modifikation der DNA in den Zellen der Keimbahn voraus. Eine **Gentherapie** ist weniger dauerhaft: Es werden lediglich in einem Teil des Körpers eines Patienten Veränderungen an den Genen vorgenommen. So kann man beispielsweise bei Patienten mit cystischer Fibrose eine partielle Heilung erzielen, indem man das Wildtypgen in die Lunge einführt. Diese Modifikationen werden jedoch nicht weitervererbt – die Allele in den Keimbahnzellen bleiben defekt.

Echte gentechnische Modifikationen am Menschen sind bislang noch Zukunftsmusik. Derzeit sind gentechnische Eingriffe auf nichtmenschliche Lebewesen beschränkt und haben zur Entstehung von transgenen Pflanzen und Tieren geführt, wie in den Kapiteln 14 und 15 beschrieben. Die Verbesserung der menschlichen Spezies durch selektive Fortpflanzung bezeichnet man als **Eugenik**. Die ursprünglichen Pläne von Eugenikern sahen vor, nach äußeren, visuellen Merkmalen und medizinischer Untersuchung „höherwertige“ Menschen auszuwählen und gezielt zur Fortpflanzung zu bringen – ähnlich wie bei preisgekrönten Rasseschweinen oder Hunden mit Stammbaum. Heute ist ein Stadium erreicht, in dem gezielte Veränderungen des menschlichen Genoms auf der Ebene der DNA technisch möglich geworden sind, wenn auch noch in recht plumper Art und Weise.

Durch gentechnische Eingriffe kann man bei Organismen Veränderungen erzeugen, die stabil vererbt werden. Bei der Gentherapie macht man sich die Genetik zunutze, um Krankheiten zu heilen, verändert dabei aber nicht die Zellen der Keimbahn. Deshalb sind diese Modifikationen auch nicht erblich.

Grundlegende Prinzipien der Gentherapie

Am einfachsten lässt sich die Gentherapie bei genetischen Störungen einsetzen, die auf einem Defekt in einem einzelnen Gen beruhen und die folglich nur auftreten, wenn beide Kopien des Gens defekt sind

– also bei rezessiven Erkrankungen. Durch Einfügen einer einzelnen normalen Kopie des Gens lassen sich solche Defekte heilen. In diesen Fällen spricht man mitunter auch von **Genersatztherapie**. Darüber hinaus vereinfacht es die Behandlung natürlich, wenn die Krankheit überwiegend nur ein Organ oder einige wenige Organe betrifft. Eine Genersatztherapie umfasst die folgenden Hauptschritte:

1. Identifikation und Charakterisierung des Gens,
2. Klonierung des Gens,
3. Auswahl des Vektors,
4. Methode der Verabreichung,
5. Expression des Gens.

Als ersten Schritt identifiziert man den Gendefekt und kloniert eine normale Kopie des betreffenden Gens (s. Kap. 10). Danach muss man das Gen in den Patienten einbringen. Dazu ist es erforderlich, einen passenden Vektor und eine geeignete Übertragungsmethode auszuwählen. Zusätzlich muss das Vektor/Gen-Konstrukt so beschaffen sein, dass es nach Einfügen in den Patienten eine entsprechende Expression des Gens ermöglicht. Die Übertragung des Gens kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Das Vektor/Gen-Konstrukt kann beispielsweise ins Blut oder in ein anderes Gewebe injiziert oder in Form eines Sprays über die Nase und die Luftwege verabreicht werden. In einigen Fällen entnimmt man dem Patienten Zellen, modifiziert diese in Kultur und pflanzt sie anschließend wieder ein. Diese Methode nennt man **ex vivo-Gentherapie**, weil der eigentliche gentechnische Eingriff außerhalb des Patienten stattfindet. (Im Gegensatz dazu spricht man bisweilen bei direkter Verabreichung des Vektor/Gen-Konstrukts an den Patienten von „*in vivo*-Gentherapie“.)

Im Labor erfolgen die meisten Manipulationen mit Genen, die auf bakteriellen Plasmiden transportiert werden. Zwar wurde gelegentlich auch eine Gentherapie direkt mit Plasmid-DNA durchgeführt, die ein therapeutisches Gen enthielt, häufiger nutzte man jedoch spezialisierte Verabreichungssysteme. In den meisten Fällen dient ein modifiziertes Virus als Vektor. Da Viren jedoch Krankheitserreger sind, muss man sie zunächst genetisch unschädlich machen, bevor man sie in der Gentherapie einsetzen kann. Bei ungefähr 70 % der am Menschen durchgeführten Gentherapien wurden virale Vektoren eingesetzt (Tabelle 17.1). Dabei fanden vor allem zwei Hauptgruppen von Viren Verwendung: Retroviren und Adenoviren. Bei einer geringen Zahl von Fällen wurde die DNA in Liposomen oder mithilfe einer Genkanone verabreicht.

Tabelle 17.1 Zur Gentherapie eingesetzte Verabreichungssysteme

verwendeter Vektor	Behandlungen	
	Zahl	Prozent
Retrovirus	273	25,4
Adenovirus	269	25,0
andere Viren	201	18,7
nackte DNA oder RNA	187	17,4
Liposomen	93	8,6
Genkanone	5	0,5
nicht klassifiziert	42	3,9
insgesamt	1076	100,0

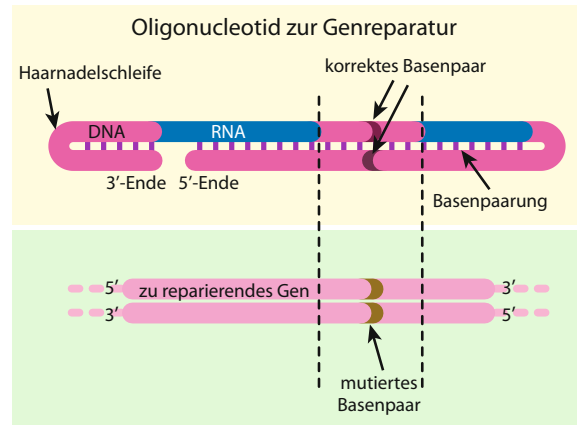
Stand von 2005. Aktuelle Daten über die Zahl und die Formen der Gentherapiebehandlungen finden sich auf der Webseite des Journal of Gene Medicine: <http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical/>

Bei der Gensatztherapie wird eine funktionsfähige Kopie des für den Gendefekt verantwortlichen Gens eingefügt. Am weitesten häufigsten erfolgt die Übertragung mithilfe eines modifizierten Virus als Vektor.

Reparatur von Genen durch Crossing-over mit Oligonucleotiden

Bei dem Begriff Gensatztherapie geht man normalerweise davon aus, dass das gesamte defekte Gen durch eine vollständige funktionsfähige Kopie des Gens ersetzt wird. Bei einigen genetischen Störungen erfolgt jedoch nur der Austausch einer einzelnen Base, oder eine Gruppe eng miteinander verbundener Basen wird verändert. In diesen Fällen kann man das Gen auch „reparieren“ statt ersetzen. Das kann durch ein Crossing-over mit einem relativ kurzen, doppelsträngigen Oligonucleotid erfolgen, das die Wildtypsequenz trägt (Abb. 17.1).

Durch Verwendung eines RNA-DNA-Hybrid-oligonucleotids lässt sich die Häufigkeit des Cros-



17.1 Reparatur eines defekten Gens durch Crossing-over mit einem Oligonucleotid

Zur Reparatur eines Gens kann man ein spezielles Oligonucleotid synthetisieren, das eine korrekte Kopie einer kurzen, spezifischen Region eines defekten Gens liefert. Dieses Oligonucleotid soll ein gezieltes Crossing-over mit dem defekten Abschnitt des Gens ermöglichen.

sing-overs erhöhen. Solche Hybridmoleküle gehen nachweislich eher ein Crossing-over ein als eine doppelsträngige DNA. Zusätzlich kann man die Enden des Oligonucleotids durch Bildung von Haarnadelschleifen schützen und so einen Abbau durch Exonucleasen verhindern. Diese Technik befindet sich noch in der Versuchsphase.

Kleine lokale Gendefekte kann man mithilfe relativ kurzer Oligonucleotide reparieren, statt das Gen durch ein vollständiges funktionsfähiges Gen zu ersetzen.

Aggressive Gentherapie

Ursprünglich lag der Gentherapie die Idee zugrunde, genetische Störungen durch Ersetzen defekter Gene zu heilen. Eigentlich gibt es aber keinen Grund dafür, warum eine Gentherapie nur „defensiv“ sein und Defekte unterdrücken sollte. Man könnte auch in die Offensive gehen und Gene liefern, deren Produkte eine Krankheit heilen, obwohl diese Gene mit der eigentlichen Ursache des Problems nichts zu tun haben. Die besten Beispiele für eine solche **aggressive**

Tabelle 17.2 Ziele für Gentherapiebehandlungen

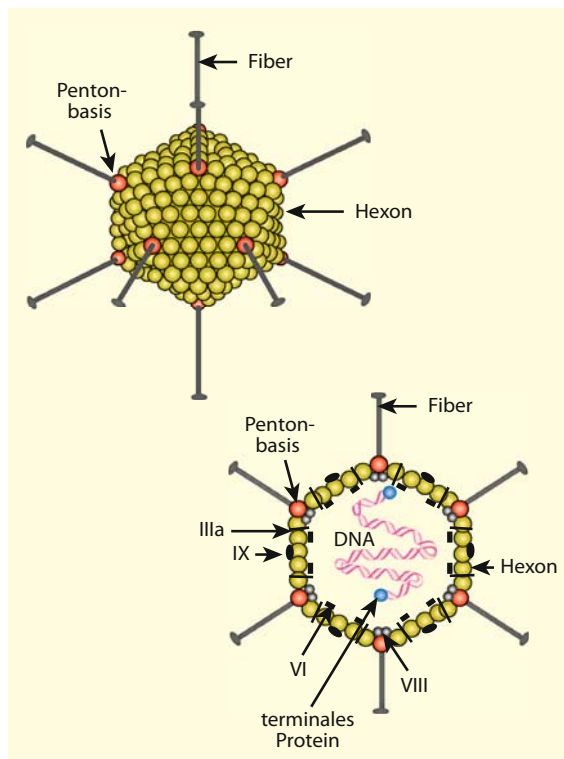
zu behandelnde Krankheit	Behandlungen	
	Zahl	Prozent
Krebs	715	66,4
Einzelgenedefekte	95	8,8
Gefäßerkrankungen	92	8,6
Infektionskrankheiten	72	6,7
andere Krankheiten	33	3,1
investigativ	69	6,4
insgesamt	1076	100,0

Gentherapie liefert die Behandlung von Krebs und nicht die Heilung von Erbkrankheiten. Hier lautet das Ziel, die Krebszellen abzutöten. Wie aus Tabelle 17.2 zu ersehen, zielen die meisten Gentherapiebehandlungen inzwischen auf Krebs ab.

Bei der aggressiven Gentherapie werden unerwünschte Zellen mithilfe von Genen abgetötet oder zerstört. Besonders nützlich ist diese Therapie gegen Krebs.

Adenoviren als Vektoren für die Gentherapie

Adenoviren sind relativ einfache doppelsträngige DNA-Viren, die Menschen und andere Wirbeltiere infizieren. Das Viruspartikel besteht aus einem einfachen ikosaederförmigen Capsid, das ein einzelnes lineares dsDNA-Molekül aus ungefähr 36 000 Basenpaaren enthält (Abb. 17.2). Die Enden der DNA sind jeweils durch ein terminales Protein geschützt. Das Capsid besteht aus 240 **Hexonen**, das sind jeweils Trimere des Hexonproteins. Benannt sind die Hexone nach ihrer sechszähligen Symmetrie. Jedes ist wiederum von sechs benachbarten Hexonen umgeben. Vom Hexonprotein ragen Schleifen aus der Virosoberfläche hervor. Adenoviren werden anhand ihrer Reaktion auf Antikörperbindung in 50 Serotypen unterteilt. Diese Variation beruht größtenteils auf den Schleifen des Hexonproteins.

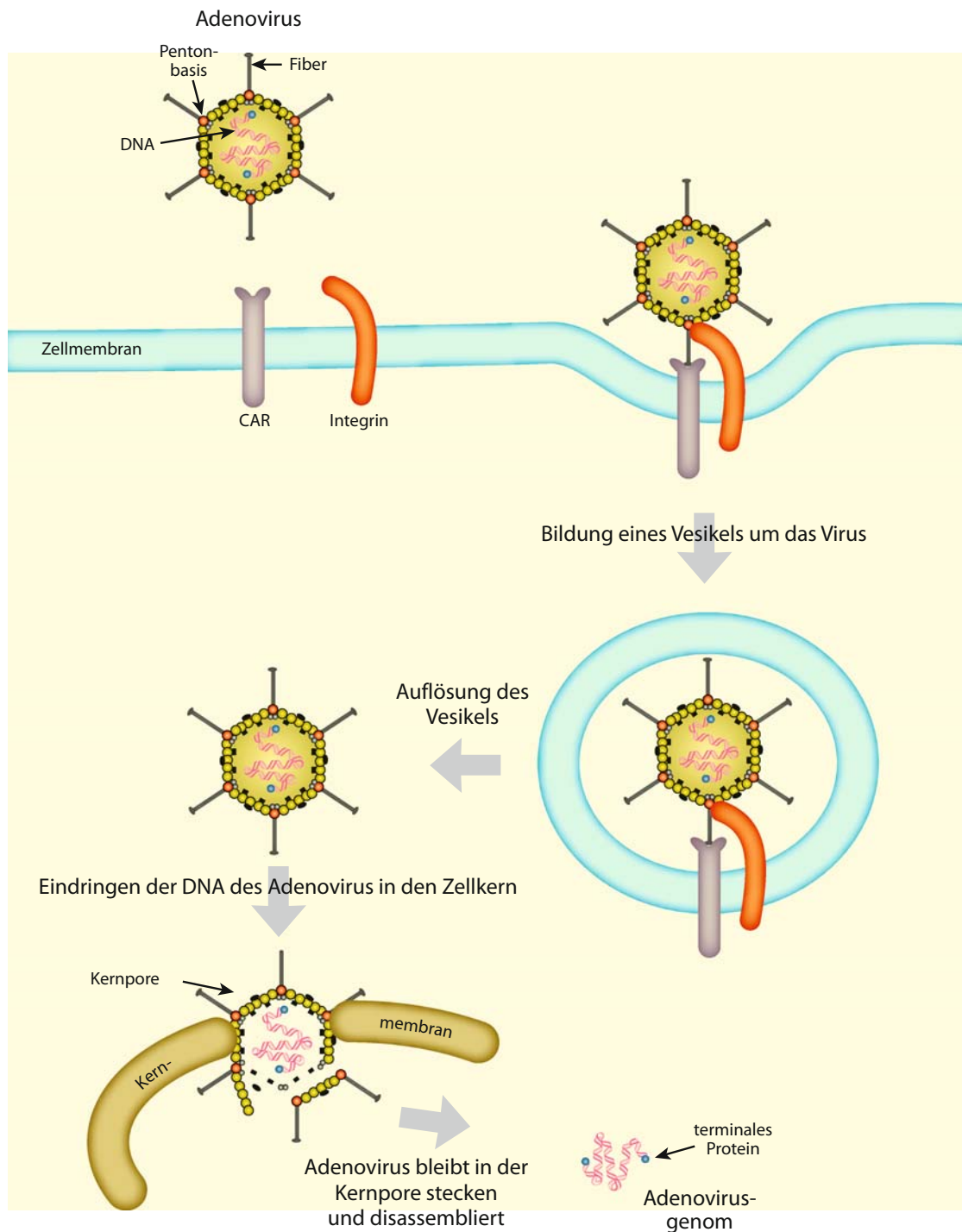


17.2 Struktur eines Adenovirus

Adenoviren bestehen aus einem ikosaederförmigen Capsid mit 20 Flächen und zwölf Eckpunkten. Jede Fläche wird aus Hexonen gebildet (gelbe Kugeln). An jedem der Eckpunkte befindet sich eine Pentonbasis (rote Kugeln) und ein als Fiber bezeichneter Fortsatz (schwarz). Die Proteine IIIa, VI, VIII und IX stabilisieren das Capsid. Innerhalb des Capsids befindet sich eine doppelsträngige DNA, deren Enden jeweils durch ein terminales Protein geschützt sind.

An jedem Eckpunkt treffen jeweils fünf Flächen des Viruspartikels aufeinander. Hier befindet sich ein **Penton**, das aus einer Basis (einem Pentamer) und einem als Fiber bezeichneten Fortsatz (einem Trimer) besteht. Die Fibern variieren bei verschiedenen Untergruppen von Adenoviren sehr in der Länge. Ihre Spitze bindet an Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellen (Abb. 17.3). Die Adenoviren haben die gleichen Rezeptoren wie Coxsackieviren der Gruppe B. Deshalb trägt dieses Protein die Bezeichnung **CAR** (für **Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor**), seine normale physiologische Funktion ist jedoch nicht bekannt.

Nach Bindung der Spitze der Fiber an den CAR bindet die Pentonbasis an Integrine auf der Oberfläche der Wirtszelle. (Integrine sind an der Zelladhä-



17.3 Eindringen von Adenoviren in menschliche Zellen

Vor dem Eindringen in menschliche Zellen erkennen Adenoviren die beiden Rezeptoren CAR und Integrin. Das Viruspartikel bindet an die Rezeptoren und wird dann an diese gebunden, von einem Membranvesikel umgeben, in die Zelle eingeschleust; im Cytoplasma löst sich dieses Vesikel dann wieder auf. Durch eine Kernpore injiziert das Adenovirus seine DNA in den Zellkern.

sion beteiligte Transmembranproteine.) Dann faltet sich die Zellmembran nach innen und bildet ein Vesikel, welches das Adenovirus in die Zelle einschleust. Durch Auflösung des Vesikels gelangt das Virus ins Cytoplasma und von dort zum Zellkern. Das Virion wird noch außerhalb des Zellkerns zerlegt, und nur die DNA (mit ihren terminalen Proteinen) gelangt in den Zellkern.

Adenoviren wurden mit als erste Viren zur Gentherapie beim Menschen eingesetzt und bieten folgende Vorteile:

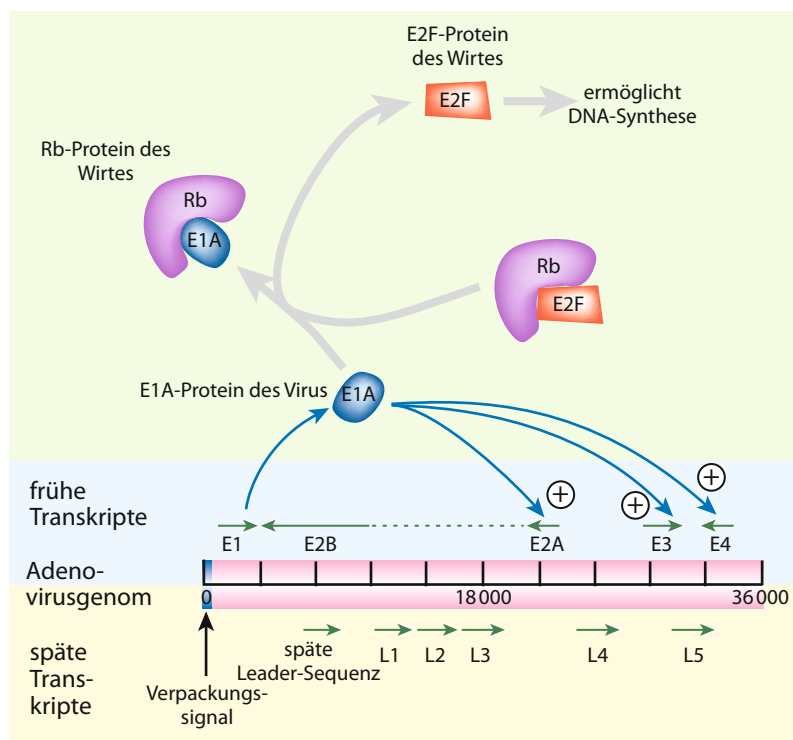
1. Adenoviren sind relativ harmlos. Sie verursachen nur schwache Infektionen von Epithelzellen, insbesondere der Epithelien von Atemwegen und Verdauungstrakt.
2. Adenoviren sind nicht onkogen (d.h. sie verursachen keine Tumoren).
3. Adenoviren lassen sich relativ leicht kultivieren und in großen Mengen produzieren.
4. Entwicklungszyklus und Biologie von Adenoviren sind gut bekannt.
5. Die Funktion der meisten Gene von Adenoviren ist bekannt.
6. Die vollständige DNA-Sequenz ist verfügbar, insbesondere für Adenoviren vom Serotyp 5 aus der Untergruppe C.

Obwohl Adenoviren im Allgemeinen relativ harmlos sind, können sie bei Patienten mit geschädigtem Immunsystem Entzündungen und ernsthafte Erkrankungen hervorrufen. Soll ein Adenovirus als Vektor für die Gentherapie verwendet werden, muss man es deshalb unschädlich machen, indem man sein Replikationssystem blockiert. Dies geschieht über eine Deletion des Gens für das **E1A-Protein**, ein sofort nach der Infektion synthetisiertes Virusprotein. E1A erfüllt zwei Funktionen (Abb. 17.4). Zum einen aktiviert es die Transkription anderer früher Virusgene. Zum anderen bindet es an das Rb-Protein der Wirtszelle, das normalerweise ein Eintreten der Zelle in die S-Phase verhindert. Das führt dazu, dass die Wirtszelle Gene für die DNA-Synthese exprimiert, die das Virus für seine eigene Replikation nutzt. Im Labor züchtet man in genetisch modifizierten Wirtszellen „verkrüppelte“ Adenoviren, deren virales E1A-Gen in die DNA der Wirtszelle eingebaut ist. Die so erzeugten Viruspartikel können sich in normalen tierischen Zellen nicht vermehren.

Die DNA von Adenoviren wird durch einen ausgeklügelten Mechanismus verpackt. Ist die DNA mehr als 5 % kürzer oder länger als die Wildtyp-DNA, schlägt die Verpackung fehl (Abb. 17.5). Durch Insertion eines therapeutischen Gens in ein Adenovi-

17.4 Funktion des E1A-Proteins von Adenoviren

Durch Eliminieren von E1A lässt sich die Replikation von Adenoviren verhindern. E1A ist ein Transkriptionsfaktor, der andere Adenovirengene wie E2A, E3 und E4 aktiviert. Zudem bindet E1A an das Rb-Protein der Wirtszelle und setzt so das E2F-Protein des Wirtes frei und aktiviert die DNA-Synthese.



rus wird die DNA länger. Sofern das eingebaute Gen sehr viel länger ist als die Deletion, die vorgenommen wurde, um die Replikation des Virus zu verhindern, kann das Viruspartikel nicht korrekt zusammengebaut werden. Lösen lässt sich dieses Problem durch Deletion weiterer nichtessenzieller Virus-DNA.

Auch wenn es gelungen ist, mithilfe von modifizierten Adenoviren Gene in die Gewebe von Tieren und Menschen einzuschleusen und dort erfolgreich zu exprimieren, ergeben sich noch Probleme. Als größte Schwierigkeit erweist sich, dass Adenovirusinfektionen sehr kurzlebig sind. Dadurch wird das therapeutische Gen nur für wenige Wochen exprimiert; dann schaltet das Immunsystem das Virus aus. Außerdem entwickeln die Patienten eine Immunität gegen das Virus, sodass eine zweite Behandlung mit dem gleichen modifizierten Virus erfolglos bleibt. Für eine langfristige Gentherapie von Erbkrankheiten sind Adenoviren als Vektoren ungeeignet.

Trotz dieser Einschränkungen lassen sich mithilfe von Adenovirusvektoren für Krebszellen tödliche Gene einschleusen, denn in diesem Fall sollte eine kurzzeitige Expression ausreichen. Der CAR-Rezeptor wird normalerweise nur von Epithelzellen in hohem Maße exprimiert, weshalb Adenoviren nur in diesen Zelltyp eindringen können. Aber auch in vielen Krebszellen erfolgt eine umfangreiche Expression des CAR-Rezeptors. Daher zielen die Gentherapiebehandlungen mit Adenoviren mittlerweile überwiegend auf Krebszellen ab (s. weiter unten).

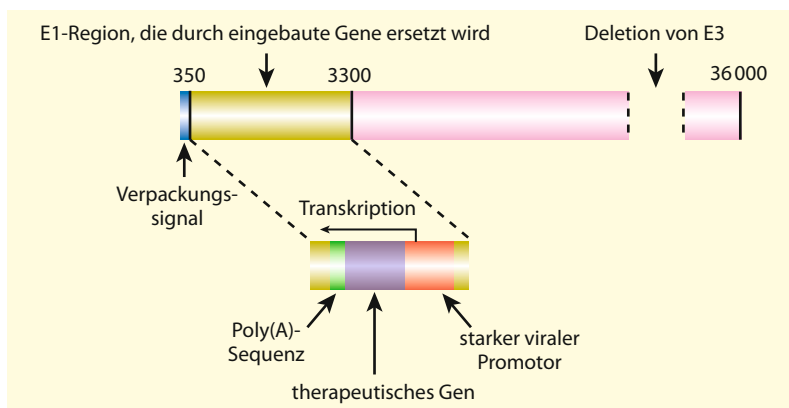
Adenoviren wurden sehr häufig als Vektoren bei der Gentherapie eingesetzt. Da das Virus letztlich vom Immunsystem eliminiert wird, eignen sich Adenoviren nur eingeschränkt für langfristige Therapien von Erbkrankheiten.

Gentherapie mit Adenoviren bei cystischer Fibrose

Weil die Lunge relativ anfällig für Virusinfektionen ist, gehörte cystische Fibrose (s. Kap. 16) zu den ersten Kandidaten für eine Gentherapie. Dazu hat man gesunde Versionen des Gens für cystische Fibrose kloniert und in ein „verkrüppeltes“ Adenovirus eingebaut. Mit Nasensprays, die dieses modifizierte Adenovirus enthielten, hat man dann zunächst Ratten und schließlich auch Menschen behandelt. In einigen Fällen wurde das gesunde Gen für cystische Fibrose exprimiert und dadurch der normale Chloridionentransport wiederhergestellt. Leider lässt die Expression über einen Zeitraum von 30 Tagen nach. Wiederholte Anwendungen erzielten kaum Wirkung, weil das Immunsystem das Virus erkennt und zerstört.

Man hofft, dass in naher Zukunft verbesserte Vektoren verfügbar sind, mit denen man cystische Fibrose durch Nasensprays, die diese genetisch modifizierten Viren enthalten, heilen kann. Zu bedenken ist hierbei jedoch, dass man mit einer derartigen Gentherapie nur die Symptome in der Lunge heilen kann; der Gendefekt in den Zellen der Keimbahn wird dadurch nicht beseitigt. Dieser kann nach wie vor an die nächste Generation weitergegeben werden.

Cystische Fibrose wurde als Ziel für eine Gentherapie ausgewählt, weil die Lungen anfällig für Virusinfektionen sind. Die ersten Behandlungen mit Adenoviren als Vektoren waren teilweise erfolgreich, aber jeweils nur für einen kurzen Zeitraum.



17.5 Gentechnisch modifiziertes Adenovirus

Die Länge der DNA in einem Viruspartikel muss der natürlichen Länge seines DNA-Stranges von 36 000 Basenpaaren sehr nahe kommen, damit eine korrekte Verpackung erfolgen kann. Das therapeutische Gen ersetzt die E1-Region. Ist das Gen sehr viel länger als *E1A*, erfolgt zusätzlich die Deletion einer Region, die das Gen *E3* enthält, um die Gesamtlänge der DNA konstant zu halten.

Adeno-assoziierte Viren

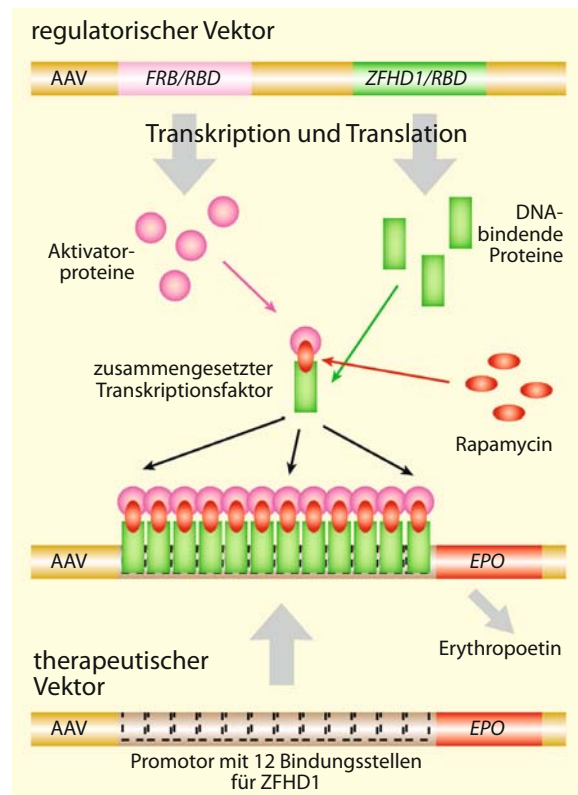
Aufgrund der gerade erwähnten Probleme mit Adenoviren hat man andere DNA-Viren als Vektoren in Betracht gezogen. Bislang ist aber keiner davon verbreitet in Gebrauch. Am vielversprechendsten sind die **Adeno-assoziierten Viren (AAV)**. AAV sind defekte oder „Satellitenviren“, die auf ein Adenovirus (oder einige Herpesviren) angewiesen sind, das einige wesentliche Funktionen bereitstellt. Infolgedessen findet man sie gewöhnlich in Zellen, die mit einem Adenovirus infiziert sind. Im Gegensatz zu Adenoviren scheinen AAV allerdings völlig harmlos zu sein.

Folgende Vorteile bringt die Verwendung von AAV:

1. Sie lösen im Wirt keine Entzündung aus.
2. Sie bewirken nicht die Bildung von Antikörpern und eignen sich daher auch für mehrfache Behandlungen.
3. Sofern ein passendes Helfervirus vorhanden ist, infizieren sie eine große Anzahl verschiedener Tiere. Daher kann man sie in vielen verschiedenen Formen tierischer Zellen züchten, etwa in Zellen von Mäusen oder Affen.
4. Im Gegensatz zu Adenoviren können sie auch in sich nicht teilende Zellen vieler Gewebe eindringen.
5. Aufgrund ihrer gewöhnlich geringen Größe können die Viruspartikel in viele Gewebe des Körpers effektiv eindringen.
6. AAV bauen ihre DNA an einer einzigen Stelle im Genom tierischer Zellen ein (beim Menschen ist dies die Stelle *AAVS1* auf Chromosom 19). Dadurch kann das therapeutische Gen auf Dauer integriert werden.

Es gibt aber auch Nachteile: Das Genom von AAV ist sehr klein (nur 4681 Nucleotide einzelsträngiger DNA), und das Virus kann nur einen relativ kurzen DNA-Abschnitt übertragen. (AAV sind insofern ungewöhnlich, als sie sowohl den Plus- als auch den Minusstrang in die Viruspartikel verpacken. Jedes Viruspartikel enthält zwar nur ein ssDNA-Molekül, eine Viruspräparation besteht jedoch aus einem Gemisch von Partikeln, von denen jeweils die Hälfte Plus- beziehungsweise Minusstränge aufweist.) Nach Eindringen in eine Wirtszelle wird die DNA in die doppelsträngige replikative Form (RF) umgewandelt, die sowohl zur Replikation als auch zur Transkription dient. In Abwesenheit eines Helfervirus integrieren AAV in das Wirtschromosom und werden latent.

Dauerhaft integrierte Gene bedürfen einer sorgfältigen Regulation. Das kann man beispielsweise durch Verwendung von zwei AAV-Vektoren lösen. Mäuse und Affen wurden in Versuchen mit einem doppelten AAV-System behandelt, das **Erythropoetin** liefert, ein für die Entwicklung von roten Blutkörperchen erforderliches Protein. Ein AAV-Vektor trägt das Gen für Erythropoetin mit einem Promotor, der durch einen Transkriptionsfaktor aktiviert werden muss. Der zweite AAV-Vektor trägt ein künstliches Regulationssystem (Abb. 17.6). Dieses besteht aus zwei Genen, die für Hybridproteine codieren, mit jeweils einer Domäne des Transkriptionsfaktors. Die andere Domäne bindet Rapamycin (das zur Im-



17.6 Das doppelte AAV-System

Um Labortiere mit Erythropoetin zu versorgen, verwendet man zwei AAV-Vektoren. Der regulatorische Vektor (oben) enthält zwei Gene, *FRB/RBD* und *ZFHD1/RBD*; diese codieren für die beiden Hälften eines Transkriptionsfaktors, die jeweils mit einer Rapamycinbindungsdomäne (RBD) verknüpft sind. Auf dem therapeutischen Vektor (unten) befindet sich strangabwärts der Transkriptionsfaktorbindungsstellen das Erythropoetingen (*EPO*). Nach Zugabe von Rapamycin wird der Transkriptionsfaktor zusammengesetzt und aktiviert das *EPO*-Gen.

munsuppression verwendet wird). In Anwesenheit von Rapamycin assoziieren die beiden Proteine über ihre Rapamycinbindungsdomänen und bilden einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor. Dieser aktiviert dann die Expression von Erythropoetin.

Bei Übertragung der beiden Vektoren auf Mäuse erfolgte keine Produktion von Erythropoetin. Wenn man den Tieren jedoch Rapamycin injizierte, wurde der Transkriptionsfaktor zusammengesetzt und das Erythropoetin dadurch aktiviert. Dann stieg die Erythropoetinmenge bis zum Hundertfachen an, und die Zahl der roten Blutkörperchen nahm zu. Selbst nach einigen Monaten löste eine Injektion von Rapamycin noch einen steilen Anstieg der Erythropoetinproduktion aus. Inzwischen werden an Patienten mit cystischer Fibrose die ersten Versuche mit AAV-Vektoren, die das *CFTR*-Gen tragen, durchgeführt.

Als neue Vektoren zur Gentherapie werden Adeno-assoziierte Viren (AAV) erforscht. Gegenüber Adenoviren haben AAV unter anderem den großen Vorteil, dass sie nicht die Bildung von Antikörpern auslösen und daher auch für eine mehrmalige Behandlung geeignet sind.

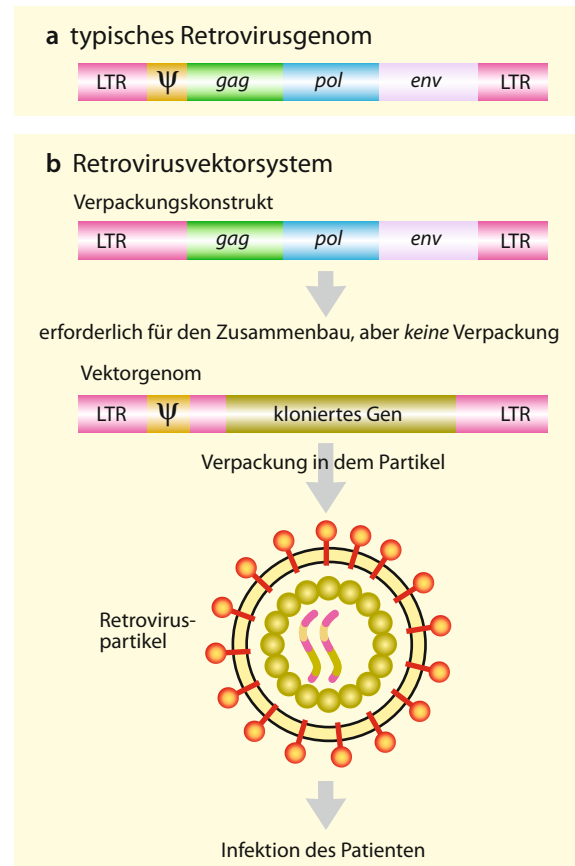
Gentherapie mit Retroviren

Retroviren können zahlreiche Zelltypen von Säugetieren infizieren, benötigen aber für eine erfolgreiche Infektion sich teilende Zellen. Nicht infiziert werden daher viele Wirtsgewebe, in denen Wachstum und Teilung der Zellen zum Stillstand gekommen sind. Außerdem durchläuft das genetische Material von Retroviren ein DNA- und ein RNA-Stadium. Das bedeutet, dass aus sämtlichen therapeutischen Genen zunächst die Introns entfernt werden müssen, bevor man sie in ein Retrovirus klonen kann. Trotz dieser hinzukommenden technischen Schwierigkeiten gelang die erste erfolgreiche Übertragung eines Gens im Rahmen einer Gentherapie beim Menschen mit Retroviren (s. weiter unten).

Ein Retroviruspartikel besteht aus einem inneren Nucleocapsid – ein RNA-Genom in einer Proteinhülle – und einer äußeren Hülle, die aus der Cytoplasmamembran der vorherigen Wirtszelle abgeschnürt wurde. Bei allen Retroviren umfasst das Genom die drei Gene *gag*, *pol* und *env*, eingeschlossen zwischen zwei langen endständigen Sequenzwiederholungen, sogenannten **LTRs** (engl. *long terminal repeats*). Komplexere Retroviren wie HIV besitzen zusätzlich noch Gene, die an der

Regulation beteiligt sind. Die LTR-Sequenzen werden für den Einbau der DNA-Version des Virusgenoms in die DNA der Wirtszelle benötigt. Zwischen dem strangaufwärts (oder in 5'-Richtung) liegenden LTR und dem *gag*-Gen befindet sich das **Verpackungssignal** (Abb. 17.7), eine wesentliche Voraussetzung für die Verpackung der RNA in das Viruspartikel.

Als Vektoren für die Gentherapie verwendete man einfachere Retroviren, vor allem das **murine**



17.7 Das Retrovirusgenom und -vektorsystem

a Das Genom von Retroviren enthält ein Verpackungssignal (ψ) sowie die Gene *gag*, *pol* und *env*, flankiert von zwei direkten Sequenzwiederholungen, sogenannten LTRs. **b** Bei der Gentherapie mit Retroviren kommen zwei Viruskonstrukte zum Einsatz. Der therapeutische Vektor trägt das klonierte Gen und das Verpackungssignal, flankiert von zwei LTRs. Der Verpackungsvektor enthält die drei für den Zusammenbau des Viruspartikels erforderlichen Gene: *gag*, *pol* und *env*. Da der Verpackungsvektor kein Verpackungssignal aufweist, wird er nicht verpackt und infiziert den Patienten nicht. Sind beide Konstrukte vorhanden, wird sowohl der therapeutische Vektor als auch das klonierte Gen in das Capsid verpackt.

Leukämievirus (MuLV; auch **Maus-Leukämievirus, MLV**). Bei den Vektoren werden sämtliche Retrovirusgene entfernt, sodass keine Replikation mehr möglich ist. Nur das Verpackungssignal und die beiden LTRs sind noch vorhanden (Abb. 17.7). Es können etwa 6–8 kb DNA eingebaut werden. Ein viraler Promotor in der 5'-LTR-Sequenz aktiviert die Expression des klonierten Gens. Weil dem Vektor die Gene *gag*, *pol* und *env* fehlen, kann er keine Viruspartikel herstellen. Diese Funktion muss daher von einem **Verpackungskonstrukt** übernommen werden, einem defekten Provirus, das in die DNA der Produzentenzelle eingebaut wird (s. Abb. 17.7). Dem Verpackungskonstrukt fehlt das Verpackungssignal. Daher ist es zwar für die Herstellung von Viruspartikeln verantwortlich, wird aber selbst nicht verpackt. Die erzeugten Viruspartikel enthalten lediglich den Retrovirusvektor mit dem klonierten Gen.

Nach Infektion des Patienten wird die RNA in dem Retrovirusvektor *revers* in eine DNA-Kopie transkribiert. (Obwohl der retrovirale Vektor selbst keine Kopie des Gens für Reverse Transkriptase aufweist, werden einige Moleküle Reverse Transkriptase in die Retroviruspartikel verpackt.) Im Idealfall wird das klonierte Gen dann, flankiert von den beiden LTR-Sequenzen, in die DNA der Wirtszelle eingebaut.

Weil die Retrovirusvektoren keinerlei Gene für retrovirale Proteine aufweisen, rufen sie keine Immunreaktion oder nennenswerte Entzündung hervor. Dass sie sich in die DNA der Wirtszelle einbauen können, hat zur Folge, dass das therapeutische Gen zu einem dauerhaften Bestandteil des Wirtszellgenoms wird. Im Prinzip könnte das Retrovirus an einer ungünstigen Stelle eingebaut werden, wo es die Regulation eines Gens der Wirtszelle beeinträchtigt. Da jedoch der größte Teil der DNA in tierischen Zellen nichtcodierend ist, ist dies sehr unwahrscheinlich, sodass nur vereinzelt Zellen geschädigt werden.

Als viel größeres Problem erweist sich, dass Retrovirusvektoren nur kleine Mengen DNA (8 kb) übertragen können und außerdem nicht imstande sind, Zellen zu infizieren, die sich nicht teilen. Die Retrovirenfamilie der Lentiviren (zu denen auch HIV gehört) weicht davon jedoch ab: Sie können auch Zellen infizieren, die sich nicht teilen. HIV selbst zu verwenden, ist natürlich zu riskant. Vielleicht besteht künftig jedoch die Möglichkeit, diese Fähigkeit auf andere, ungefährlichere Retroviren zu übertragen. Alternativ könnte man als Vektoren auch Lentiviren verwenden, die andere Säugetiere infizieren, wie FIV (felines Immundefizienz-Virus).

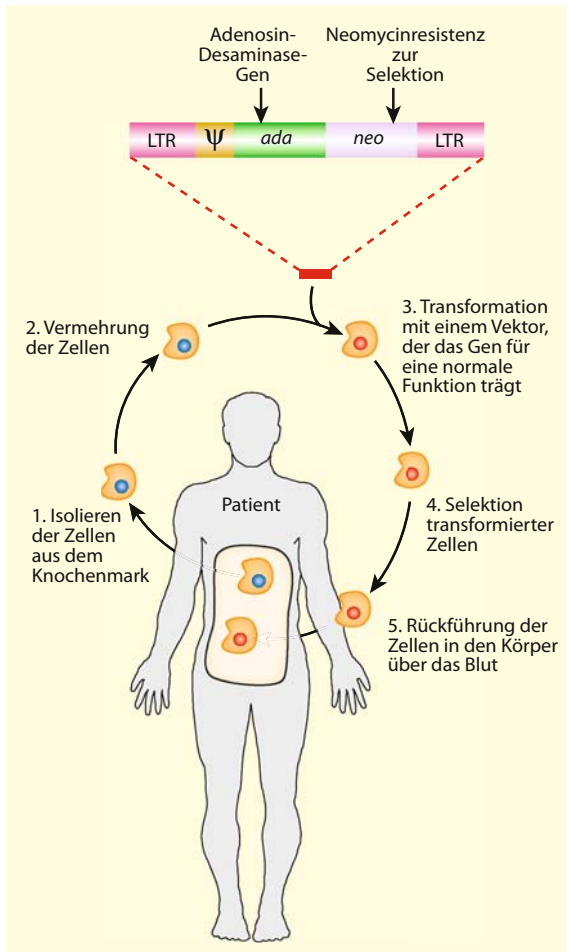
Modifizierte Retroviren werden in der Gentherapie am häufigsten als virale Vektoren eingesetzt. Dazu vermehrt man defekte Retroviren in Zellen mit einem integrierten Helfervirus, das die Bildung von Viruspartikeln ermöglicht.

Gentherapie mit Retroviren bei SCID

Der schwere kombinierte Immundefekt **SCID** (engl. *severe combined immunodeficiency*) tritt auf, wenn sowohl die B-Zellen als auch die T-Zellen des Immunsystems defekt sind – mit der Folge, dass die Immunantwort fast völlig gestört ist. Kinder mit SCID müssen von jeglichen Kontakten mit anderen Menschen fern gehalten werden und werden daher in speziellen sterilen Plastikzelten isoliert. Ohne Immunschutz kann jede Krankheit, selbst eine einfache Erkältung, tödlich verlaufen. SCID wird nachweislich durch mehrere Gendefekte verursacht. Bei etwa 25 % davon handelt es sich um Mutationen des **Ada-Gens**, welches für das Enzym **Adenosin-Desaminase** codiert. Dieses wird für den Stoffwechsel von Purinbasen benötigt. Ein Mangel an diesem Enzym verhindert die Entwicklung der Lymphocyten (jener weißen Blutkörperchen, zu denen auch die B- und T-Zellen gehören).

Beim ersten Fall einer erfolgreichen Gentherapie beim Menschen mittels eines Retrovirusvektors wurde einem Kind mit SCID eine funktionsfähige Kopie des *Ada*-Gens übertragen. Die von SCID betroffenen Zellen sind Lymphocyten, die im Blut zirkulieren und der Immunüberwachung dienen. Sie entstehen durch Teilung von Knochenmarkszellen (Abb. 17.8). Für die Gentherapie werden dem Patienten Knochenmarkszellen entnommen und außerhalb des Körpers in Zellkultur kultiviert. Da Knochenmarkszellen ständig das Blut erneuern, teilen sie sich häufig und eignen sich für eine Infektion mit Retroviren. Noch in der Zellkultur infiziert man die Knochenmarkszellen mit einem genetisch modifizierten Retrovirus, welches das *Ada*-Gen trägt, und bringt sie anschließend wieder in den Körper zurück.

Seit 1991 wurden schon mehrere Kinder mit dieser Methode behandelt. Da T-Zellen jedoch nur eine Lebensdauer von sechs bis zwölf Monaten haben, muss man die ganze Prozedur in regelmäßigen Abständen wiederholen. Dieses Problem konnte man durch die Verwendung von **Blutstammzellen** (oder **hämatopo-**



17.8 Retrovirale Gentherapie ex vivo bei ADA-Mangel

Für eine Gentherapie bei SCID muss man dem Patienten Knochenmarkszellen entnehmen. Diese Zellen werden dann kultiviert, und das mutierte *Ada*-Gen wird durch eine funktionsfähige Kopie ersetzt. Um alle nichttransformierten Zellen abzutöten, behandelt man die Zellkultur mit Neomycin. Anschließend erfolgt die Rückführung der Knochenmarkszellen in den Patienten. Diese produzieren dann wieder Blut mit normalen Blutkörperchen.

etischen Stammzellen) umgehen, die sich teilen und die Vorläuferzellen für alle Formen von Blutzellen bilden, aber auch weitere Stammzellen hervorbringen. Man findet sie im Knochenmark, allerdings nur in sehr geringer Zahl. Nabelschnurblut enthält einen viel höheren Anteil an Stammzellen. Deshalb entnahm man 1993 Blutstammzellen aus dem Nabelschnurblut mehrerer Neugeborener, die nachweislich homozygot für den *Ada*-Defekt waren. Mithilfe eines Retrovirusvektors schleuste man ein gesundes *Ada*-Gen in diese

Stammzellen ein und schuf auf diese Weise einen langfristigen Vorrat an gesunden T-Zellen.

In all den gerade erwähnten Fällen erhielten die Patienten neben der Gentherapie noch Injektionen mit gereinigtem ADA-Enzym. Daher ist nicht klar, in welchem Ausmaß die Gentherapie für die Besserung verantwortlich ist, auch wenn diese Patienten nun funktionsfähige T-Zellen in ihrem Blut aufweisen. Ein eindeutigeres Ergebnis erhielt man vor kurzem bei einer anderen Variante von SCID. Diese Variante beruht auf Defekten in dem Rezeptor für mehrere **Interleukine**, darunter auch IL-7, ein Protein das die Entwicklung von T-Zellen aus Stammzellen stimuliert. Da B-Zellen für ihre Funktion Helfer-T-Zellen benötigen, sind sowohl B- als auch T-Zellen inaktiv. In diesem Fall hat man mithilfe eines Retrovirusvektors das Gen für die fehlende Untereinheit des IL-7-Rezeptors in kultivierte Stammzellen eingeschleust.

Weil zur Behandlung dieser Form von SCID kein gereinigtes Protein verwendet wird, waren die Patienten ausschließlich auf die Gentherapie angewiesen. Die Patienten entwickelten eine normale Zahl von T-Zellen und wurden erfolgreich gegen mehrere Infektionskrankheiten geimpft, was auf eine entsprechende Immunantwort schließen lässt. Daraufhin konnten sie die Isolation der Plastikzelle verlassen und ein normales Leben führen. Von dem Dutzend Patienten, die auf diese Weise behandelt wurden, geht es den meisten nach wie vor gut. Einer bekam jedoch Leukämie – vermutlich, weil sich das Retrovirus in andere Gene einbaute. Für die Verwendung von Retroviren in der Gentherapie sind also weitere Sicherheitsmaßnahmen erforderlich, bevor man sie routinemäßig einsetzen kann.

Einige Formen des schweren kombinierten Immundefekts SCID konnten durch eine Gentherapie mittels eines Retrovirusvektors erfolgreich behandelt werden.

Nichtvirale Gentherapie

So ausgeklügelt ein System mit Viren als Vektoren auch sein mag: Nichtvirale Vektoren bieten von Natur aus eine höhere Sicherheit. Trotzdem wurden sie relativ vernachlässigt, weil sich Viren einfach als effizienter erwiesen. Mit viralen Vektoren, vor allem Retroviren, sind jedoch mehrere unglückliche Unfälle passiert. So kam es gelegentlich zum Ausbruch Leukä-

mie-ähnlicher Krankheiten. Dadurch ist das Interesse an nichtviralen Vektorsystemen wieder aufgeflammt.

Bei rund 75 % der Gentherapiebehandlungen dienten Viren als Vektoren. Man hat aber auch einige alternative Methoden ausprobiert, von denen sich bislang allerdings nur wenige als effizient erwiesen haben bzw. verbreitet im Einsatz sind. Dazu gehören:

1. Die Verwendung von nackten Nucleinsäuren (DNA oder seltener RNA). Viele tierische Zellen kann man auch direkt mit gereinigter DNA transformieren. Dazu wird das therapeutische Gen in ein Plasmid eingebaut und die Plasmid-DNA direkt verwendet. Etwa 10–20 % der Gentherapiebehandlungen wurden mit ungeschützten Nucleinsäuren vorgenommen.
2. Genkanonen. Hierbei wird die DNA gebunden an Metallpartikel durch die Zellwände und -membranen geschossen. Ursprünglich entwickelt wurde diese Methode zur Übertragung von DNA in Pflanzenzellen. Daher wird sie in Kapitel 14 näher besprochen. Sie wurde aber auch zum Erzeugen transgener Tiere und gelegentlich auch beim Menschen eingesetzt.
3. Rezeptorvermittelte Aufnahme. Hierbei ist die DNA an ein Protein gebunden, das von einem Zelloberflächenrezeptor erkannt wird. Bei der Aufnahme des Proteins in die Zelle wird die DNA mit aufgenommen.
4. DNA-Polymer-Komplexe. Durch Bindung an ein positiv geladenes Polymer wie Polyethylenimin wird die negativ geladene DNA geschützt. Solche Komplexe werden häufig von Zellen in Kultur aufgenommen und können prinzipiell für eine *ex vivo*-Gentherapie verwendet werden.

5. Verkapselte Zellen. Für diese Methode werden Zellen so modifiziert, dass sie ein benötigtes Protein exprimieren und sezernieren. Sie werden dann in einer porösen Polymerhülle verkapselt und lokal injiziert. So hat man beispielsweise alten Ratten Fremdzellen injiziert, die Nervenwachstumsfaktor ausscheiden. Anschließend zeigten die Ratten verbesserte kognitive Fähigkeiten. Das deutet darauf hin, dass diese Methode zur Behandlung von Erkrankungen wie Alzheimer geeignet sein könnte.
6. Liposomen sind kugelige, aus Phospholipiden bestehende Vesikel. Sie wurden bei rund 10 % der Gentherapiebehandlungen eingesetzt (s. unten).

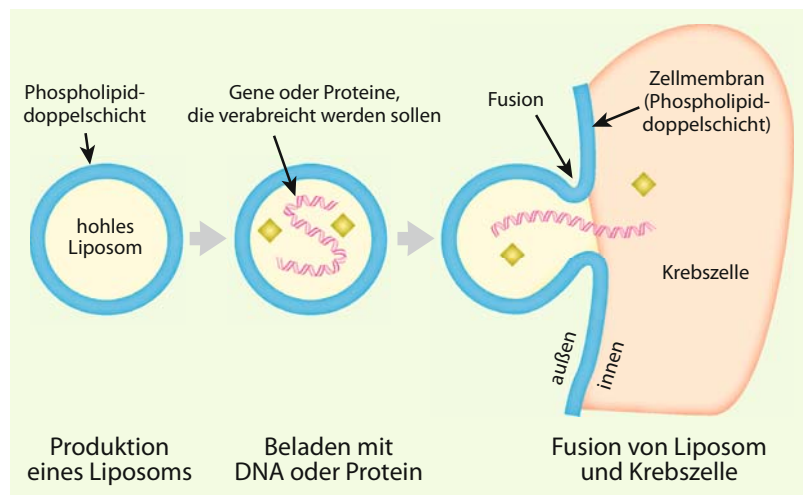
Fremd-DNA kann auch mithilfe verschiedener anderer Methoden als durch Viren in Zielzellen eingeschleust werden. Dazu gehören die Verwendung von nackter DNA, die Bindung von DNA an Polymere oder Proteine, Genkanonen und Liposomen.

Liposomen und Lipofektion in der Gentherapie

Wie gerade erwähnt, erfolgt rund ein Zehntel der Gentherapiebehandlungen mithilfe von **Liposomen**. Das sind mikroskopisch kleine, kugelförmige Vesikel aus einer Phospholipiddoppelschicht. Diese kann man während ihrer Entstehung mit Nucleinsäuren oder anderen Molekülen beladen. Die Liposomen

17.9 Verabreichung eines Wirkstoffs gegen Krebs durch Lipofektion

Liposomen sind kugelförmige Vesikel, umgeben von einer Lipiddoppelschicht. Den inneren Hohlraum kann man mit DNA oder Proteinen wie TNF befüllen. Aufgrund ihrer hydrophoben Lipidschichten gehen Liposomen und Zellmembranen eine Wechselwirkung ein, die beim Kontakt zum Verschmelzen führt. Dabei wird der Inhalt des Liposoms in die Zelle entleert.



verschmelzen mit den Membranen fast aller tierischen Zellen und setzen dabei ihren Inhalt in die Zellen frei (Abb. 17.9). Diesen Prozess bezeichnet man als **Lipofektion**. Die Lipofektion funktioniert zwar recht gut, ist aber ziemlich unspezifisch, weil die Liposomen mit den Membranen jeglicher Zellen verschmelzen.

Bei einer Gentherapie gegen Krebs stellt sich das erhebliche Problem, Fremd-DNA spezifisch in Krebszellen einzuschleusen (s. weiter unten). Die Lipofektion ist in dieser Hinsicht recht vielversprechend, denn entsprechend „bewaffnete“ Liposomen kann man direkt in das Tumorgewebe injizieren. Wahrscheinlich sind Liposomen sogar nützlicher für die Verabreichung von Proteinen als von DNA, weil das mit Viren als genetisch modifizierten Vektoren nicht möglich ist. So kann man Liposomen beispielsweise mit toxischen Proteinen wie **Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF)** beladen und in Tumorgewebe injizieren. Dort verschmelzen die Liposomen mit den Zellmembranen der Krebszellen, und die tödlichen Proteine werden in die Krebszellen freigesetzt.

Liposomen sind mikroskopisch kleine, kugelförmige Vesikel aus Phospholipiden. Mit ihnen kann man Fremd-DNA oder Proteine direkt in ein Zielgewebe einschleusen.

Aggressive Gentherapie gegen Krebs

Die meisten Formen von Krebs werden zwar nicht über die Keimbahn vererbt, aber dennoch zählt Krebs zu den genetisch bedingten Krankheiten. Bei einer Erbkrankheit kann man versuchen, die defekten Komponenten zu ersetzen und so den Zelltod zu verhindern. Bei der Behandlung von Krebs müssen jedoch die Krebszellen zerstört oder zumindest ihr Wachstum und ihre Teilung verhindert werden. Dazu gibt es mehrere Strategien, die sich folgendermaßen einteilen lassen:

1. Genersatztherapie,
2. direkter Angriff,
3. Selbstmordgene,
4. Immunprovokation.

Die Genersatztherapie bei Krebs ist analog zu der, die zur Kompensation von genetischen Störungen

eingesetzt wird. Zunächst analysiert man den Krebs und identifiziert das auslösende mutierte Gen (bzw. die mutierten Gene). Dann wird die Wildtypversion des Onkogens oder Tumorsuppressorgens in die Krebszellen eingebaut. So hat man beispielsweise die Wildtypvariante des p53-Gens in Krebszellen ohne p53 eingeschleust. Die Übertragung erfolgt im Allgemeinen mithilfe eines Adenovirus als Vektor, gelegentlich wurden auch Liposomen verwendet.

Bei der Strategie des direkten Angriffs verwendet man ein Gen, das hilft, die Krebszellen abzutöten. Zum Beispiel codiert das **TNF-Gen** für den Tumornekrosis-Faktor. Dieser wird von bestimmten weißen Blutkörperchen produziert, den **tumorinfiltrierenden Lymphocyten (TILs)**. Diese Zellen infiltrieren normalerweise Tumoren und setzen dort TNF frei. Kleinere Krebstumoren lassen sich dadurch recht effektiv bekämpfen. Zur Bekämpfung großer Krebstumoren, deren Wachstum außer Kontrolle geraten ist, muss die TNF-Produktion erhöht werden. Dazu wird zunächst das *TNF*-Gen kloniert – oder vielleicht auch ein verbessertes *TNF*-Gen mit erhöhter Aktivität – und in die weißen Blutkörperchen eingeschleust. Anschließend werden die Blutzellen dem Patienten wieder zurückinjiziert.

Zwar kann man Krebszellen mit TNF sehr effektiv abtöten, TNF ist jedoch auch toxisch für andere Zellen. Daher sind hohe Dosen von TNF für den Patienten gefährlich. Dieses Problem hat zwei Aspekte. Zum einen müssen TNF oder andere toxische Wirkstoffe auf die Krebszellen beschränkt werden. Zum anderen muss die toxische Substanz auch zu den relativ unzugänglichen Zellen im Innern eines Tumors gelangen. Um diese Probleme zu lösen, hat man verschiedene Modifikationen getestet. Beispielsweise hat man das *TNF*-Gen der Kontrolle eines induzierbaren Promotors unterstellt und das Gen mithilfe eines Adenovirus in die Krebszellen eingeschleust. Der Promotor wird so ausgewählt, dass er durch Agenzien induziert wird, die bereits zur Bekämpfung von Krebszellen eingesetzt werden, wie Strahlung oder Cisplatin.

Die Selbstmordstrategie stellt eine Mischform zwischen einer Arzneimitteltherapie und einer Gentherapie bei Krebs dar. Dazu wird eine harmlose Verbindung, eine sogenannte **Prodrug**, verwendet, die mithilfe eines speziellen Enzyms in einen toxischen Wirkstoff gegen Krebs umgewandelt werden kann. Wird dieses Enzym in einer Zelle exprimiert, so begeht diese Zelle bei Verabreichung der Prodrug Selbstmord (Abb. 17.10). Deshalb muss man für diese Methode ein Enzym auswählen, das in normalen

Exkurs 17.1

Therapie mit embryonalen Stammzellen

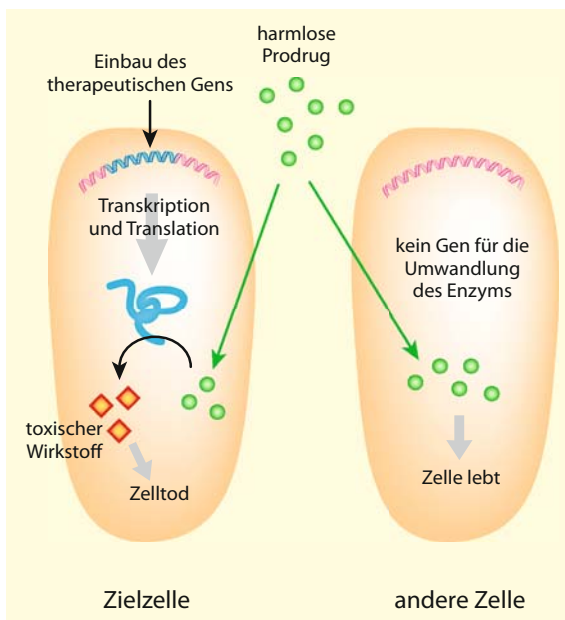
Statt defekte Gene zu ersetzen, könnte es in Zukunft möglich sein, ganze Zellen auszutauschen und die Ersatzzellen so zu manipulieren, dass daraus defekte Gewebe oder Organe wieder regeneriert werden. Gegenwärtig geht man dabei von der Verwendung embryonaler Stammzellen aus. Das sind ursprüngliche Stammzellen aus frühen Embryonalstadien, die sich zu anderen, weniger generalisierten Stammzellen differenzieren können. Aus diesen gehen dann wiederum die endgültigen Gewebe und Organe des Körpers hervor.

Die Verwendung embryonaler Stammzellen hat ethische, religiöse, politische und gelegentlich sogar wissenschaftliche Debatten ausgelöst, in denen die Angelegenheit unnötig aufgebauscht wurde. So sind Behauptungen, mit Stammzellen ließen sich sämtliche Störungen und Krankheiten heilen, absolut überzogen.

Derzeit lassen sich zahlreiche Stammzelllinien recht zuverlässig in Kultur aufrechterhalten. Wie erste Versuche gezeigt haben, können sich diese Stammzellen nach Implantation in Tiere noch teilen und differenzieren.

Bislang hat man jedoch noch keine Möglichkeit, genau zu steuern, wie sich die Stammzellen differenzieren. Insbesondere ist es schwierig, ihre Teilung und weitere Differenzierung zu unterbinden, nachdem sie geschädigtes Gewebe ersetzt haben. So hat man beispielsweise versucht, die Insulin-sekretierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse mithilfe von Stammzellen zu ersetzen; nach einer Phase der Insulinproduktion folgte jedoch ein unkontrolliertes Wachstum, das zur Bildung eines Teratoms führte.

Besonders paradox an der Debatte um Stammzellen ist: Wenn über die Zelldifferenzierung erst einmal genügend bekannt ist, um Stammzellen entsprechend zu manipulieren, werden sie wahrscheinlich nicht mehr benötigt. Sobald es möglich ist, die Regulationskreise der Zelldifferenzierung zu steuern, sollte es auch eine Möglichkeit geben, adulte Zellen zu verwenden und diese zu Pseudostammzellen zu dedifferenzieren. Damit werden sich die mit der Verwendung embryonaler Stammzellen einhergehenden ethischen Probleme in Luft auflösen.

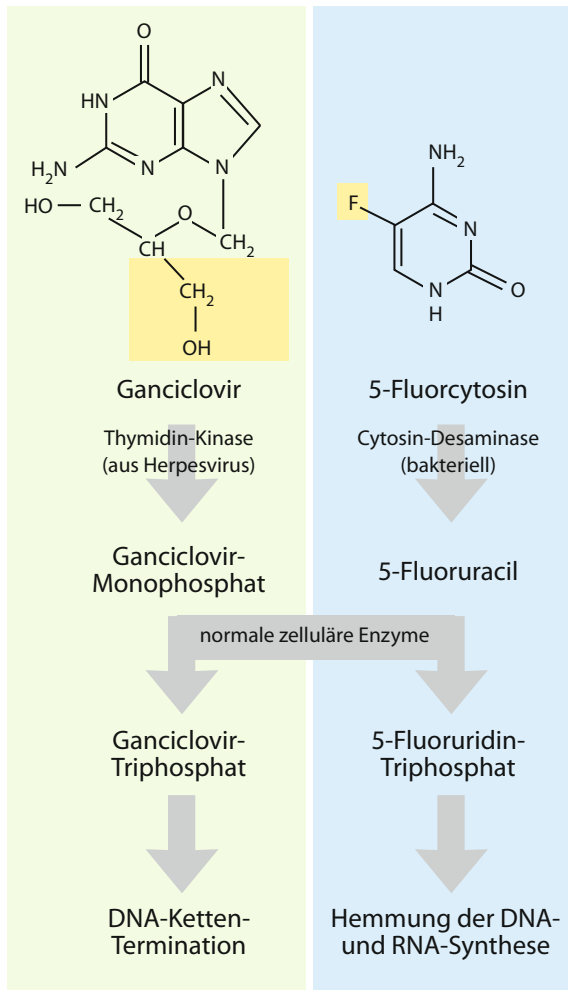


17.10 Gentherapie mit Selbstmordgenen

Für eine Gentherapie mit Selbstmordgenen wird zunächst in die Krebszellen ein therapeutisches Gen eingeschleust. Dieses Gen codiert für ein Enzym, das eine nichttoxische Prodrug in eine toxische Verbindung umwandelt. Weil dieses Suizidenzym nur in den Krebszellen vorhanden ist, sind alle anderen Zellen davon nicht betroffen.

menschlichen Zellen nicht vorhanden ist. Das Gen, das für das Suizidenzym codiert, muss in die Krebszellen eingeschleust werden, in der Regel mittels eines viralen Vektors oder in Liposomen. Bei erfolgreicher Expression des Enzyms im Krebsgewebe wird in den Krebszellen der toxische Wirkstoff synthetisiert. Nun kann man dem Patienten auf normalem Weg die Prodrug verabreichen, und diese entfaltet spezifisch in den Krebszellen ihre letale Wirkung.

In der praktischen Anwendung wurden im Wesentlichen zwei Suizidenzym/Prodrug-Kombinationen eingesetzt. Beispielsweise wurde mit dieser Methode der Gentherapie das ursprünglich aus dem Herpesvirus stammende Enzym **Thymidin-Kinase** in Krebszellen übertragen. Dieses Enzym wandelt die nichttoxische Prodrug, das Nucleosidanalogen **Ganciclovir**, in sein Monophosphat um (daher auch die klinische Verwendung bei der Behandlung von Herpesinfektionen). Weil die Thymidin-Kinase ausschließlich in den Krebszellen enthalten ist, sind sämtliche anderen Zellen nicht betroffen. Normale zelluläre Enzyme wandeln dann das Monophosphat in Ganciclovir-Triphosphat (GCV-TP) um. Dieses fungiert als **DNA-Ketten-Terminator** (Abb. 17.11). DNA-Polymerase baut das GCV-TP in wachsende DNA-Stränge ein. Das Fehlen einer 3'-OH-Gruppe verhindert jedoch eine weitere Verlängerung des Nu-



17.11 Ganciclovir und 5-Fluorocytosin

Ganciclovir wird in Zellen, die das Enzym Thymidin-Kinase (aus dem Herpesvirus) enthalten, in einen DNA-Ketten-Terminator umgewandelt. Ähnlich erfolgt die Umwandlung von 5-Fluorocytosin in Zellen mit einer Cytosin-Desaminase (aus Bakterien) in einen Inhibitor der DNA- und RNA-Synthese. Die gelb hervorgehobenen Gruppen verhindern die Addition weiterer Nucleotide. Die Gene für Thymidin-Kinase oder Cytosin-Desaminase müssen mit einer gentherapeutischen Methode in die Krebszellen eingeschleust werden.

cleinsäurestranges. Somit wird die DNA-Synthese inhibiert und die Zelle abgetötet. Ähnlich ist der Verlauf bei der Umwandlung von 5-Fluorocytosin in 5-Fluoruracil durch **Cytosin-Desaminase**, die ursprünglich aus Bakterien stammt. Auch hier erledigen wieder zelluläre Enzyme die Aufgabe durch die Herstellung des phosphorylierten Nucleosids, das die DNA- und RNA-Synthese inhibiert.

Eine indirektere Methode macht sich die natürliche Abwehr des Körpers zunutze. Das menschliche Immunsystem kann Krebs relativ effizient abtöten – vorausgesetzt, es erkennt ihn bereits in einem recht frühen Stadium. Die Krebszellen müssen, um zu überleben, irgendwie die Überwachung durch das Immunsystem des Körpers umgehen. Für diese Methode der Gentherapie wird ein Gen eingebaut, das die Aufmerksamkeit des Immunsystems auf die Tumorzellen lenkt. Auf der Oberfläche von Säugetierzellen sind beispielsweise die HLA-Proteine (oder MHC-Proteine) exponiert und dienen der Zellerkennung. Verschiedene Individuen besitzen unterschiedliche Kombinationen von **HLA-Genen**; diese fungieren als molekulare Identitätsmarker, durch die die Zellen des Körpers als die „eigenen“ erkannt werden. Schleust man in Krebszellen **HLA-Gene** ein, die bei dem betreffenden Individuum ursprünglich nicht vorhanden sind, so wird der Tumor als fremd erkannt, und das Immunsystem rüstet zum Angriff.

Bei einer verwandten Methode werden **Cytokine** verwendet. Das sind kurze Proteine, die Immunzellen anziehen und deren Teilung und Entwicklung stimulieren. Mithilfe der Gene für mehrere Cytokine der Interleukinfamilie (insbesondere IL2, IL4 und IL12) hat man schon Immunangriffe auf Krebszellen provoziert.

Bei der aggressiven Gentherapie werden durch die modifizierten Gene keine defekten Gene ersetzt, sondern direkt die Krebszellen angegriffen. In einigen Fällen dienen die therapeutischen Gene dazu, die Aktivität der körpereigenen Krebsbekämpfung zu erhöhen. In anderen Fällen aktiviert das Produkt des therapeutischen Gens spezifisch in den Krebszellen einen toxischen Wirkstoff.

Antisense-RNA und andere Oligonucleotide

Eine **Antisense-RNA** bindet an die entsprechende mRNA und verhindert deren Translation durch die Ribosomen. Mittlerweile testet man Antisense-RNA und verwandte Antisense-Nucleinsäuren auf potenzielle therapeutische Wirkungen. In den meisten Fällen lautet das Ziel, die Expression eines Zielgens zu verhindern. Bei der Verwendung von Antisense-RNA bieten sich vor allem zwei Alternativen. Erstens kann

man ein vollständiges **Antisense-Gen** verwenden, das in eine vollständige Antisense-RNA transkribiert wird. Das Antisense-Gen muss mithilfe eines geeigneten Vektors übertragen und in den Zielzellen exprimiert werden. Zweitens kann man auch viel kürzere künstliche RNA-Oligonucleotide verwenden. Eine Antisense-RNA aus 15 bis 20 Nucleotiden kann häufig spezifisch an einen Abschnitt der komplementären mRNA binden und so die Translation verhindern.

Der Einsatz eines vollständigen Antisense-Gens wurde experimentell gegen Krebszellen in Zellkultur überprüft. Die häufigste, das Gehirn betreffende Krebsform beim Menschen ist das maligne Gliom. Hierbei wachsen und teilen sich die Gliazellen, die das interstitielle Gewebe zwischen Nervenzellen bilden, auf unkontrollierte Weise. Oftmals ist das auf eine Überproduktion des Wachstumsfaktors **IGF-1** (engl. *insulin-like growth factor 1*) zurückzuführen, der Wachstum und Teilung dieser Zellen stimuliert. Man hat einen Vektor konstruiert, der ein *anti-IGF-1*-Gen trägt. Dazu verwendete man die cDNA-Version des **IGF-1-Gens** und kehrte einfach ihre Orientierung um (Abb. 17.12). Das *anti-IGF-1*-Gen wurde

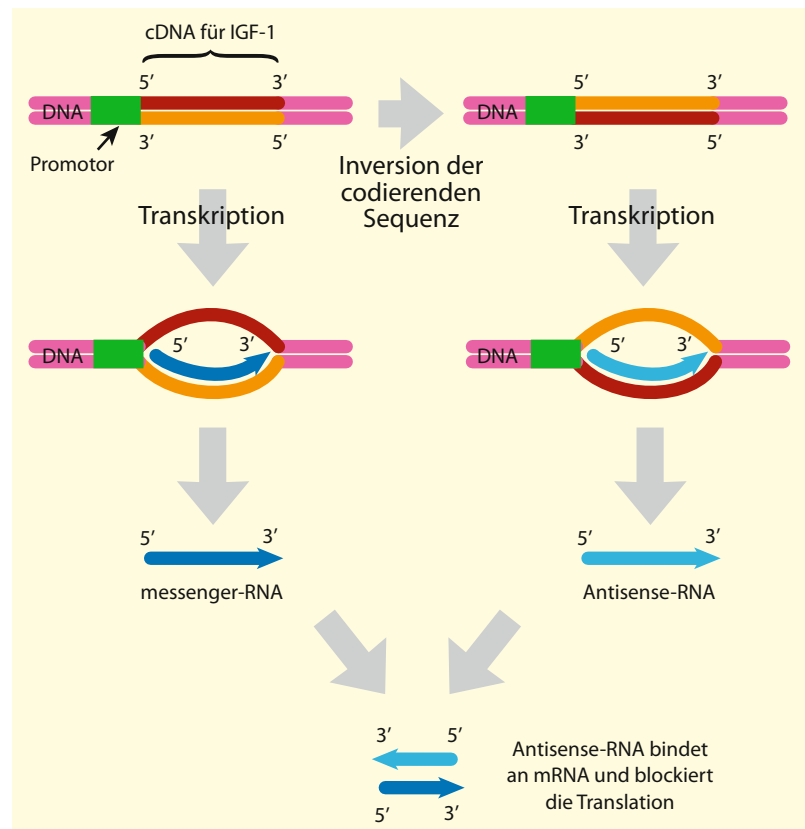
der Kontrolle eines **Metallothionein**-Promotors unterstellt, der bereits auf Spuren von Schwermetallen reagiert. Diesen Vektor baute man in kultivierte Gliomzellen ein. Durch Zugabe geringer Mengen Zinksulfat konnte das *anti-IGF-1*-Gen angeschaltet und die Teilung der Krebszellen gestoppt werden. In Ratten injiziert riefen diese Zellen keine Tumoren mehr hervor.

Mit künstlichen RNA-Oligonucleotiden kann man auf viele verschiedene Stellen der Ziel-RNA abzielen. Sie können darauf ausgerichtet sein, das 5'-Ende des Transkripts zu blockieren und somit die Translation von Beginn an zu verhindern. Andere Stellen innerhalb der mRNA erweisen sich aber häufig als genauso effektiv. Man kann auch ein Antisense-Oligonucleotid herstellen, das die Spleißstelle des Primärtranskripts blockiert und so die Bildung der reifen mRNA durch das Spleißosom verhindert (Abb. 17.13).

Die Antisense-RNA-Oligonucleotide sind nicht besonders stabil und werden von vielen Zellen nur schlecht aufgenommen. Durch Einschleusen der Antisense-RNA mit Liposomen könnte man dieses Aufnahmeproblem umgehen. Als weitere Möglich-

17.12 Gentherapie gegen Krebs mit vollständigen *antisense*-Genen

Durch umgekehrten Einbau des cDNA-Gens für IGF-1 wurde daraus eine RNA transkribiert, die komplementär zu der mRNA des Wildtyp-IGF-1-Gens war. Nach Transformation dieses Antisense-Konstrukts in Gliazellen, band die Antisense-RNA sämtliche Wildtyp-IGF-1-mRNA und blockierte so die Produktion des IGF-1-Proteins. Reguliert wurde das Antisense-IGF-1-Gen von einem Metallothionein-Promotor, der nur in Anwesenheit von Schwermetallen aktiviert wird.



keit bietet sich die Verwendung modifizierter Oligonucleotide an. Aus DNA anstelle von RNA erstellte Antisense-Sequenzen sind ebenso effektiv, aber einfacher zu synthetisieren und stabiler als RNA. Oligonucleotide mit Phosphorthioatbindungen zeichnen sich durch eine höhere Stabilität aus als solche mit Phosphodiesterbindungen. Extrem stabil sind solche aus Peptidnucleinsäuren.

Weil es an wirkungsvollen Mitteln gegen Malaria fehlt und weltweit immer mehr Fälle dieser Krankheit auftreten, testet man nun Antisense-Reagenzien gegen Malaria. Versuchsweise hat man mithilfe von Antisense-Oligonucleotiden (die in Wirklichkeit aus DNA mit Phosphorthioatbindungen bestehen) die Synthese von Aldolase bei *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der malignen Form der Malaria, blockiert. Aldolase ist das vierte Enzym der Glykolyse, und die im Blut lebenden Stadien von *P. falciparum* gewinnen ihre Energie fast ausschließlich aus der Glykolyse. Die Antisense-Moleküle zielten sowohl auf die Spleißstellen auf der prä-mRNA als auch auf den Startpunkt der Translation auf der reifen mRNA ab. Als die Aldolaseaktivität sank, erlangten die Malariaparasiten nicht mehr genügend Energie und stellten Wachstum und Teilung weitgehend ein. Ebenfalls überprüft werden Antisense-Reagenzien, die auf Topoisomerase II und Clag9 abzielen (die für

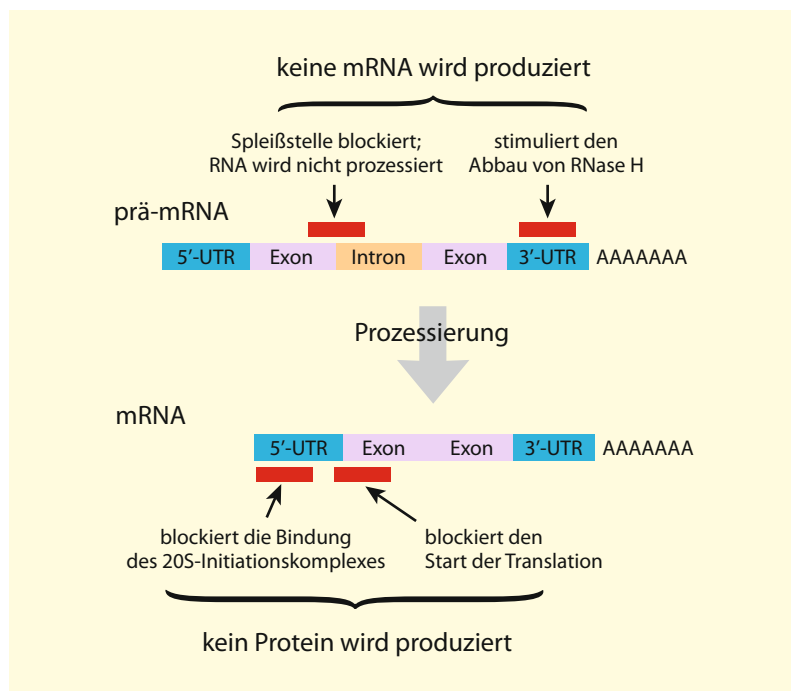
die Bindung an das CD36-Protein der roten Blutkörperchen benötigt werden).

Mithilfe von Antisense-RNA-Oligonucleotiden kann man die Expression spezifischer mRNAs verhindern. Für einen klinischen Einsatz müssen noch die Probleme der Stabilität und Übertragung überwunden werden.

Aptamere – Blockieren von Proteinen mit RNA

Theoretisch könnten Antisense-Oligonucleotide die Genexpression auch beeinträchtigen, indem sie die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA verhindern. Viele DNA-bindende Proteine weisen relativ kurze Erkennungssequenzen auf. Daher könnten kurze Oligonucleotide die DNA-Bindungsstelle des Proteins blockieren. Ohne einen aktiven Transkriptionsfaktor würde das Zielgen nicht transkribiert.

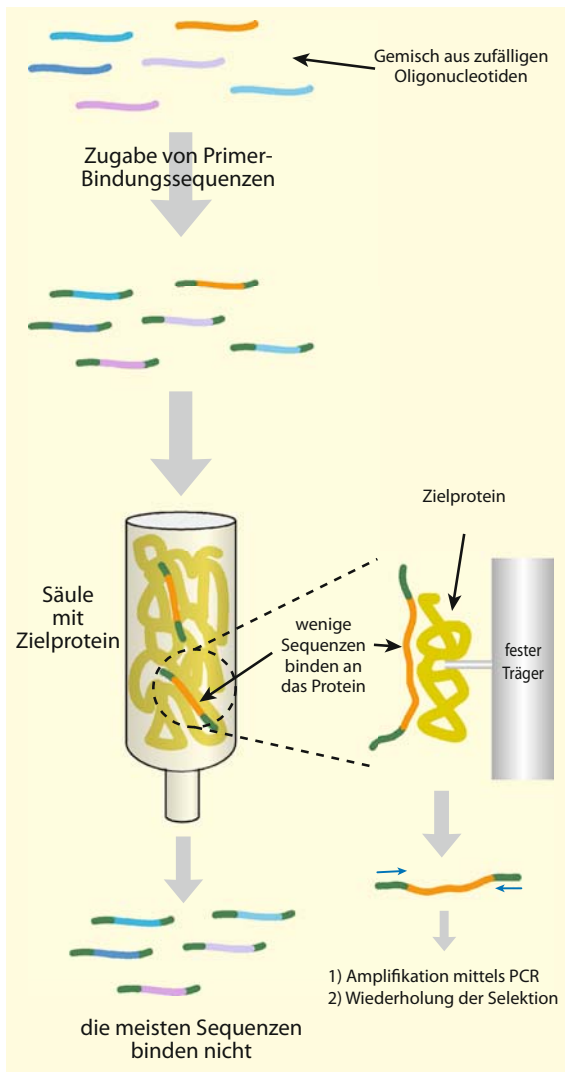
Im Prinzip könnte man für Bindungsstellen jeglicher Form ein passendes künstliches Oligonucleotid herstellen. Selbst wenn ein Enzym normalerweise



17.13 Ziele für Antisense-Oligonucleotide

Antisense-Oligonucleotide binden an Spleißstellen und 3'-UTR-Sequenzen (untranslatierte Sequenzen am 3'-Ende) und verhindern so, dass prä-mRNA (das Primärtranskript) in mRNA prozessiert wird. Die Antisense-Oligonucleotide können auch an die 5'-UTR-Sequenzen und an den Translationsstartpunkt auf der mRNA binden und so die Translation in ein Protein blockieren.

nicht an Nucleinsäuren bindet, könnte man ein Oligonucleotid erzeugen, welches das aktive Zentrum des Proteins blockiert. Solche Oligonucleotide entsprechen nicht den natürlichen Nucleinsäuresequenzen und werden **Aptamere** genannt. Experimentell



17.14 Selektion von Aptameren gegen Enzyme

Um ein Oligonucleotid zu finden, das an ein spezifisches Enzym bindet, synthetisiert man einen Pool von Oligonucleotiden mit zufälligen Sequenzen. Für die spätere PCR-Amplifikation werden die Enden jeweils mit kurzen Primer-Bindungssequenzen verknüpft. Anschließend lässt man den Pool aus zufälligen Oligonucleotiden durch eine Säule mit dem Zielenzym laufen. Oligonucleotide, die das Enzym erkennen, bleiben an der Säule haften, während alle anderen durchlaufen. Die an die Säule gebundenen Sequenzen kann man isolieren und mittels PCR amplifizieren.

konnte man diese Vorgehensweise anhand des Enzyms **Thrombin** zeigen, einer Protease, die an der Blutgerinnungskaskade beteiligt ist. Das Antithrombin-Aptamer ist kurzlebig, weil es *in vivo* rasch abgebaut wird. Zur Verhinderung der Blutgerinnung, könnte es sich beispielsweise bei Bypass-Operationen als nützlich erweisen.

Aptamere können durch eine Kombination aus molekularer Selektion und PCR-Amplifikation hergestellt werden. Dazu synthetisiert man mittels Festphasensynthese zufällige Oligonucleotide (aus 50 oder 60 Basen), wobei man für jeden Schritt ein Gemisch aus allen vier Basen verwendet. Die Enden der zufälligen Sequenzen dieses Pools werden dann jeweils durch Ligation mit (etwa 20 Basen langen) Primer-Bindungssequenzen verknüpft. Danach lässt man das Gemisch durch eine Säule laufen, an die das Zielprotein gebunden ist (Abb. 17.14). Einige der Oligonucleotide binden an das Protein und werden so von der Säule zurückgehalten. Diese werden dann dissoziiert und durch PCR amplifiziert. Die gebundenen Oligonucleotide stellen ein Gemisch dar: Manche binden schwach, andere stark. Daher wiederholt man die Bindungs- und PCR-Schritte zwei- bis dreimal, um nur Oligonucleotide mit hoher Bindungsaffinität zu selektieren.

Im Jahr 2004 wurde in den USA, 2006 dann auch in Europa, Pegaptanib (Macugen; von Eyetech Pharmaceuticals, Pfizer, New York) zur Behandlung der Erblindung durch altersbedingte Maculadegeneration zugelassen. Pegaptanib ist ein Aptamer, das die Wirkung einer Isoform des Wachstumsfaktors VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) inhibiert. Dieser ist für eine anormale Gefäßneubildung im Auge verantwortlich. Die Bindung von Pegaptanib an VEGF verhindert, dass dieser an seinen Rezeptor bindet.

Mit kurzen künstlichen Nucleotiden, die man als Aptamere bezeichnet, kann man die Aktivität bestimmter Proteine blockieren.

Ribozyme in der Gentherapie

RNA-Moleküle mit katalytischen Fähigkeiten werden **Ribozyme** genannt. Einige Ribozyme entfalten ihre Wirkung durch Spaltung anderer RNA-Moleküle. Die katalytischen Domänen solcher Ribozyme führen die Reaktion fusioniert mit anderen Domänen aus, die das RNA-Substrat durch Basenpaarung erkennen

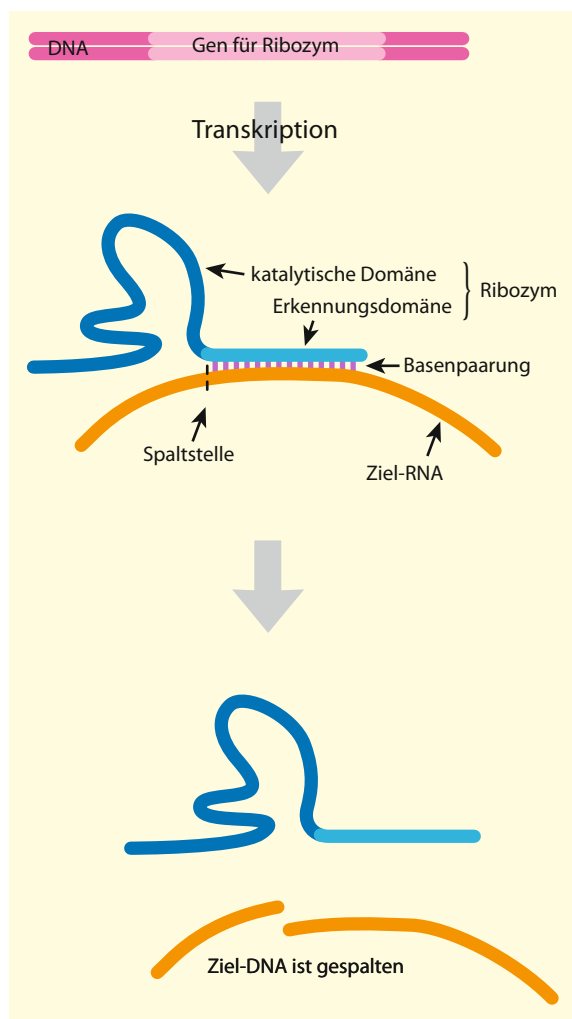
(Abb.17.15). Wird die Sequenz der Substraterkennungsdomäne verändert, so erkennt das Ribozym ein anderes Ziel-RNA-Molekül. Man könnte also Ribozyme erzeugen, die jedes beliebige Ziel-mRNA-Molekül erkennen und zerstören. Bislang befindet sich diese Verwendungsmöglichkeit der Ribozyme noch in der Versuchsphase. In der Praxis würde man für die Übertragung in die Zielzelle wahrscheinlich einen Vektor verwenden, der ein für das Ribozym codierendes Gen trägt. Die Transkription dieses Gens

würde zur Produktion der Ribozym-RNA führen. Das Ribozym schließlich würde an die Ziel-mRNA binden und diese spalten.

Sämtliche natürlich vorkommenden Nucleinsäurenzyme bestehen aus RNA. Chemisch gesehen gibt es jedoch keinen Grund, warum DNA nicht auch katalytisch wirken sollte. Tatsächlich kann man mit Sequenzen, die denen der RNA-Ribozyme entsprechen, künstlich **Desoxyribozyme** synthetisieren. Die DNAzyme werden weniger leicht abgebaut und können mittels PCR-Techniken in zahllosen Kopien hergestellt werden.

Die meisten derzeit erforschten DNAzyme sind gegen Krebszellen oder infektiöse Mikroorganismen gerichtet. Die Antibiotikaresistenz von Bakterien entwickelt sich zu einem immer größeren Problem. Eine interessante Möglichkeit, dieses zu lösen, ist die Verwendung von DNAzymen, um die mRNA für Enzyme zu spalten, welche den Bakterien die Antibiotikaresistenz verleihen. Dann könnten die Bakterien mithilfe der Antibiotika abgetötet werden, obwohl sie ein Resistenzgen besitzen.

Ribozyme, die RNA-Zielmoleküle spalten, wurden als potenzielle therapeutische Agenzien ins Spiel gebracht.



17.15 Zielgerichtete Ribozyme

Im Rahmen einer Gentherapie kann auch ein Gen für ein Ribozym in eine defekte Zelle übertragen werden. Das Ribozym hat zwei Domänen: Die katalytische Domäne fungiert als Enzym, die Erkennungsdomäne bindet an eine spezifische Ziel-RNA. Nach der Bindung spaltet die katalytische Domäne die Ziel-RNA.

► Weiterführende Literatur

- Aartsma-Rus A, van Ommen GJ (2007) Antisense-mediated exon skipping: A versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* 13: 1609–1624
- Athanasopoulos T, Graham IR, Foster H, Dickson G (2004) Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther* 11 (Suppl. 1): 109–121
- Bagheri S, Kashani-Sabet M (2004) Ribozymes in the age of molecular therapeutics. *Curr Mol Med* 4: 489–506
- Conese M, Boyd AC, Di Gioia S, Auriche C, Ascenzioni F (2007) Genomic context vectors and artificial chromosomes for cystic fibrosis gene therapy. *Curr Gene Ther* 7: 175–187
- Devi GR (2006) siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 13: 819–829
- Duan D (2006) Challenges and opportunities in dystrophin-deficient cardiomyopathy gene therapy. *Hum Mol Genet* 15: R253–R261
- Fichou Y, Férec C (2006) The potential of oligonucleotides for therapeutic applications. *Trends Biotechnol* 24: 563–570

- Foster K, Foster H, Dickson JG (2006) Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther* 13: 1677–1685
- Fritz JJ, Gorbatyuk M, Lewin AS, Hauswirth WW (2004) Design and validation of therapeutic hammerhead ribozymes for autosomal dominant diseases. *Methods Mol Biol* 252: 221–236
- Gleave ME, Monia BP (2005) Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 468–479
- Jang JH, Lim KI, Schaffer DV (2007) Library selection and directed evolution approaches to engineering targeted viral vectors. *Biotechnol Bioeng* 98: 515–524
- Lee JE, Choi JH, Lee MG (2005) Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing: Haplotype-based testing and analysis. *Mutat Res* 573: 195–204
- Li SD, Huang L (2006) Gene therapy progress and prospects: Non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther* 13: 1313–1319
- Loewen N, Poeschla EM (2005) Lentiviral vectors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99: 169–191
- Lu PY, Xie F, Woodle MC (2005) *In vivo* application of RNA interference: From functional genomics to therapeutics. *Adv Genet* 54: 117–142
- Pelletier R, Caron SO, Puymirat J (2006) RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases. *Curr Gene Ther* 6: 131–146
- Warrington KH Jr, Herzog RW (2006) Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Human Genet* 119: 571–603
- Wilton SD, Fletcher S (2006) Modification of pre-mRNA processing: Application to dystrophin expression. *Curr Opin Mol Ther* 8: 130–135
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno associated virus serotypes: Vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14: 316–327

Molekularbiologie von Krebs

Krebs hat eine genetische Grundlage

Umweltfaktoren und Krebs

Normale Zellteilung: der Zellzyklus

Die Zellteilung reagiert auf externe Signale

Gene, die bei Krebs eine Rolle spielen

Onkogene und Protoonkogene

Nachweis von Onkogenen durch Transformation

Mutationstypen, durch die Onkogene entstehen

Das *ras*-Onkogen – Überaktivierung des Proteins

Das *myc*-Onkogen – Überproduktion des Proteins

Tumorsuppressorgene oder Antionkogene

Die Antionkogene *p16*, *p21* und *p53*

Bildung eines Tumors

Ererbte Anfälligkeit für Krebs

Krebserregende Viren

Gentechnische Erzeugung krebsabtötender Viren

Weiterführende Literatur

Krebs hat eine genetische Grundlage

Genau wie Erbkrankheiten hat auch Krebs eine genetische Grundlage. Unter Erbkrankheiten versteht man genetische Störungen, die über die Keimzellen an andere Individuen weitergegeben werden. Damit bei vielzelligen Organismen auftretende Mutationen an die Nachkommen weitervererbt werden, müssen sie in den Zellen der Keimbahn auftreten, aus denen Eizellen und Spermienzellen hervorgehen. Im Gegensatz dazu sind Krebserkrankungen auf einen einzigen vielzelligen Organismus beschränkt und werden nicht an die nächste Generation weitergegeben. Bei einer Mutation in einer somatischen Zelle – also in einer der Zellen, aus denen der übrige Körper aufgebaut ist – ergeben sich verschiedene Möglichkeiten (Abb. 18.1). Besonders nachteilig können sich Mutationen auswirken, die in einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung auftreten, da aus jeder Zelle des Embryos während der Entwicklung zahlreiche weitere Zellen hervorgehen. Findet eine gravierende Mutation in einer der einzelnen Vorläuferzellen eines wichtigen Organs oder Gewebes statt, kann dies schwerwiegende oder sogar tödliche Folgen haben. Die meisten der später auftretenden **somatischen Mutationen** betreffen nur eine oder wenige Zellen und werden kaum von Bedeutung sein.

Dennoch gibt es somatische Mutationen, die erst nach Erreichen der Geschlechtsreife auftreten und trotzdem gefährlich für den Organismus sind. **Krebs** entsteht durch somatische Mutationen, die die regulatorischen Systeme zur Kontrolle von Zellwachstum und Zellteilung schädigen. Oft beginnt Krebs damit, dass eine einzelne Zelle beginnt, zu wachsen und sich wieder zu teilen, nachdem sie Wachstum und Teilung vermeintlich schon lange eingestellt hat (Abb. 18.1). Krebs entwickelt sich in mehreren Stadien und über mehrere Mutationen. Als Erstes geht die normale Kontrolle einer Zelle über die Zellteilung verloren. Als Zweites teilt sich diese abnormale (mutierte) Zelle und bildet einen Mikrotumor. Im menschlichen Körper werden zahlreiche Mikrotumoren gebildet. Die meisten davon werden vom Immunsystem zerstört, andere verbleiben über Monate oder Jahre in einem Ruhestadium.

Kleine Mikrotumoren, die aus bis zu einer Million Zellen bestehen, treten in ein solches Ruhestadium ein, weil sie keine Möglichkeit haben, Nährstoffe zu erlangen. Treten jedoch weitere Mutationen auf, so

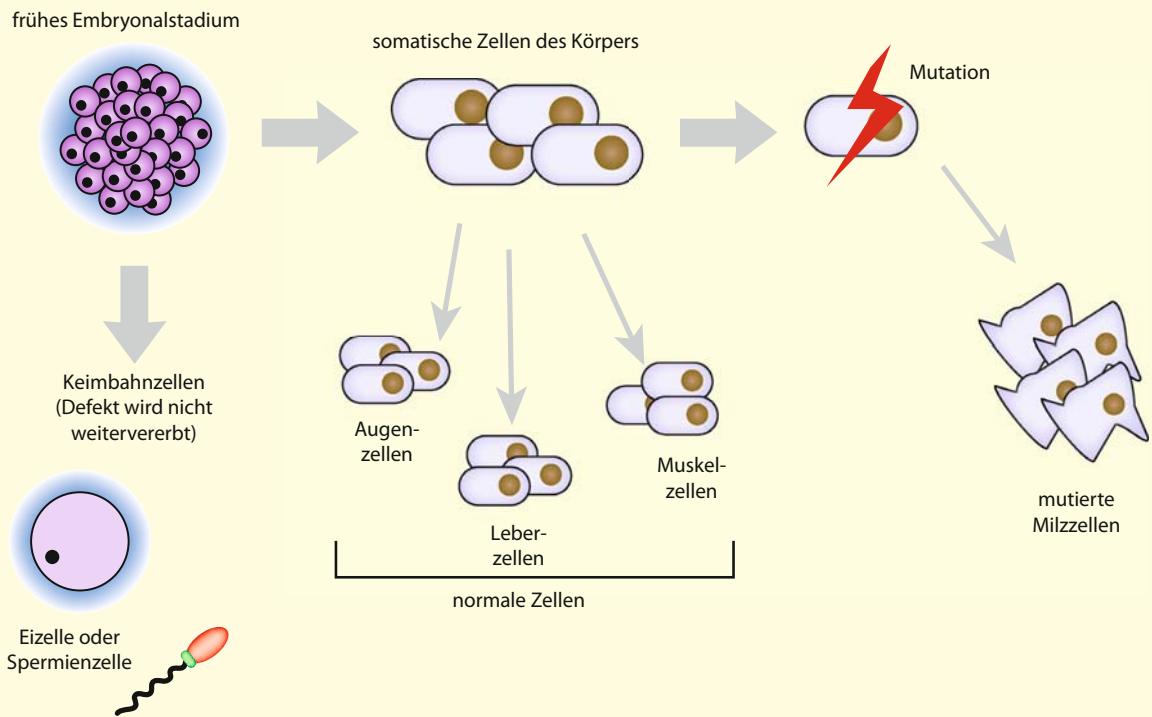
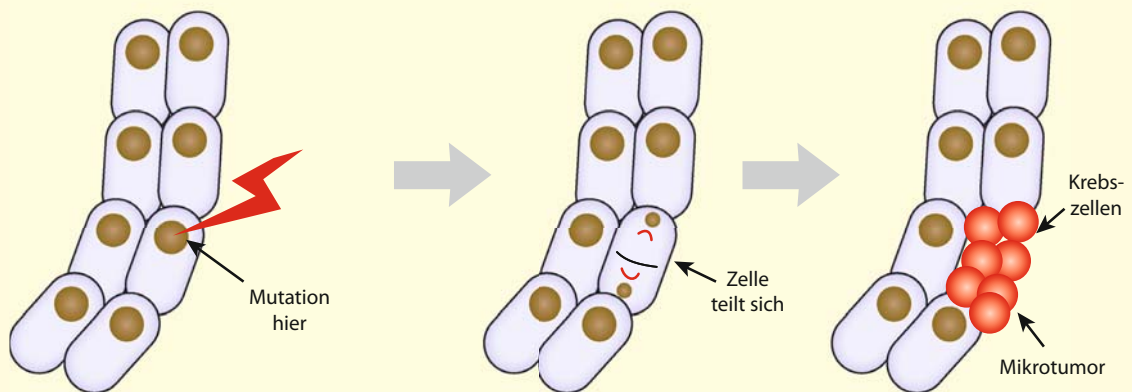
kann es sein, dass der Tumor Blutgefäße ausbildet. Die mutierten Krebszellen senden Signalmoleküle an die umgebenden Gewebe aus, die Gefäßendothelzellen anziehen. Diese organisieren sich dann in einem als **Angiogenese** bezeichneten Prozess zu Blutgefäßen. Wenn der Mikrotumor seine eigene Blutversorgung hat, kann der Tumor zu einer großen Masse weiterwachsen. Verbleibt diese an einer Stelle, so spricht man von einem benignen oder gutartigen Tumor. Nach dessen chirurgischer Entfernung bleiben beim Patienten meist keinerlei Schäden zurück. Aufgrund weiterer Mutationen kann ein Krebs aber schließlich auch die Fähigkeit erlangen, in andere Gewebe einzudringen und Sekundärtumoren zu bilden. Krebsformen mit solchen malignen oder bösartigen Tumoren, die sich bereits ausgebreitet haben, sind weitaus schwieriger zu heilen.

Bei Krebs handelt es sich um somatische Mutationen, welche die Kontrolle von Zellteilung und Zelltod stören. Zur Bildung von Mikrotumoren sind mehrere somatische Mutationen erforderlich. Wenn sich in Mikrotumoren Blutgefäße bilden, wachsen sie zu großen Tumoren aus.

Umweltfaktoren und Krebs

Rauchen, chemische Schadstoffe in der Umwelt und radioaktive Strahlung können Krebs auslösen. All diese Faktoren verursachen jedoch zunächst Mutationen. Da Krebs größtenteils durch Mutationen in somatischen Zellen entsteht, können mutationsauslösende Chemikalien – also Mutagene – auch Krebs hervorrufen. Ähnlich führt Strahlung, welche die DNA schädigt, zu Mutationen und Krebs. Aber nicht durch jede Mutation entsteht letztendlich auch Krebs. Die meisten Mutationen betreffen noch nicht einmal die transkribierten Regionen der DNA, und selbst wenn ein bestimmtes Gen davon betroffen ist, ist dieses nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit an der Kontrolle der Zellteilung beteiligt.

Einige krebsauslösende Mutationen gehen auf Umweltfaktoren zurück, andere dagegen entstehen spontan infolge von Fehlern während der Replikation der zellulären DNA. Krebsauslösende Faktoren nennt man **Karzinogene** oder **Cancerogene**. Fast alle Karzinogene sind auch Mutagene. Gelegentlich treten Unstimmigkeiten aufgrund des Stoffwechsels im Körper auf, gewöhnlich in der Leber. Bestimmte Substanzen, die nicht mit der DNA selbst reagieren,

a somatische Mutation**b Krebs****18.1 Krebs entsteht durch somatische Mutationen**

a Frühe Embryonen enthalten Keimbahnzellen, aus denen sich Eizellen und Spermien entwickeln, sowie somatische Zellen, aus denen der übrige Organismus aufgebaut ist. Je nach Zeitpunkt des Auftretens wirkt sich eine somatische Mutation gewöhnlich nur auf einen kleinen Teil des gesamten Organismus aus, beispielsweise auf die Milz. **b** Krebs entsteht, wenn eine somatische Zelle aufgrund von Fehlern bei der DNA-Replikation oder durch Einwirkung eines Karzinogens mutiert. Die Mutation ermöglicht einer Zelle, bei der eigentlich gar keine Teilung mehr erfolgen sollte, sich zu teilen. Die mutierten Zellen teilen sich kontinuierlich weiter und bilden einen Mikrotumor.

können vom Körper so modifiziert werden, dass die Derivate mit DNA reagieren. In diesem Fall ist die Originalverbindung definitionsgemäß ein Karzinogen, aber streng genommen kein Mutagen.

Ungefähr 80 % der Krebsformen entwickeln sich aus den Epithelzellen, welche die äußere Hülle von Geweben bilden. Zu den Epithelzellen gehören die Zellen der Hautoberfläche sowie Zellen der Schleimhaut von Darmtrakt und Lunge. Weil die äußersten Schichten ständig abgetragen werden, müssen sich die darunter liegenden Schichten kontinuierlich weiter teilen. Zellen von Geweben, in denen es nur selten zur Zellteilung kommt, entwickeln sich nur sehr selten zu Krebszellen. (Nerven- und Muskelkrebs machen nur 3–4 % aller Krebsformen aus.) Insgesamt gesehen sind die Zellen der Oberflächen auch viel häufiger gefährlichen Chemikalien und schädlicher Strahlung ausgesetzt.

Karzinogene sind krebsauslösende Faktoren. Mutagene verursachen Veränderungen des genetischen Codes einer Zelle. Fast alle Karzinogene sind auch Mutagene.

Normale Zellteilung: der Zellzyklus

Besser verständlich wird die Entstehung von Krebs, wenn man sich den Verlauf einer normalen Zellteilung ansieht. Bei eukaryotischen Zellen besteht der Zellzyklus aus vier Stadien (s. Kap. 4 und Abb. 4.9).

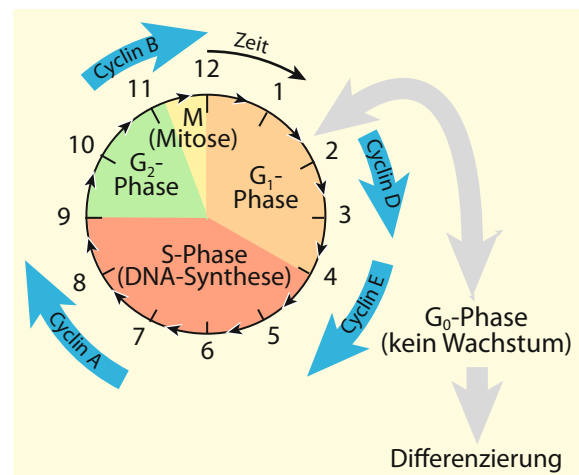
1. **G₁-Phase** (*gap*-Phase 1) – Wachstum der Zelle;
2. **S-Phase** (Synthesephase) – Duplikation von DNA und Chromosomen;
3. **G₂-Phase** (*gap*-Phase 2) – Wachstum der Zelle und Vorbereitung auf die Teilung;
4. **M-Phase** (Mitosephase) – Teilung der Zelle und des Zellkerns.

Die Zellen können auch aus diesem Zyklus von Wachstum und Teilung ausscheren und in die **G₀-Phase** (von engl. *gap* = Lücke) eintreten. Die meisten sich nicht teilenden Zellen befinden sich in der G₀-Phase. Viele davon differenzieren sich und teilen sich danach unter normalen Umständen nie wieder (Abb. 18.2).

Den Übergang von einer Phase in die nächste ermöglichen als **Cycline** bezeichnete Proteine, von denen es für jede der vier Hauptphasen eines gibt. Die Cycline fungieren als eine Art „Sicherheits-Check“:

Sie überwachen die Umwelt und stellen sicher, dass vor dem Fortschreiten des Zellzyklus das vorherige Stadium auch wirklich richtig abgeschlossen ist. Dabei arbeiten die Cycline mit **Cyclin-abhängigen Kinasen** (**CDKs**; engl. *cyclin-dependent kinases*) zusammen. Wenn das Cyclin für einen bestimmten Schritt des Zellzyklus feststellt, dass die Bedingungen geeignet sind, bindet es an die entsprechende CDK (Abb. 18.3). Dadurch wird diese aktiviert und phosphoryliert eine Reihe weiterer Proteine – die Enzyme und Strukturproteine, die am Vorgang der Zellteilung beteiligt sind. Diese Proteine befinden sich im Wartezustand, bis sie durch die Phosphorylierung aktiviert werden. Die Wirkung der Cycline versucht man mittels mehrerer Antionkogene zu unterbinden (s. weiter unten).

Der wahrscheinlich kritischste Punkt ist der Übergang zwischen der G₁- und der S-Phase; er wird durch die beiden Transkriptionsfaktoren **E2F** und **p53** zusammen mit dem Protein **pRB** (dem Produkt des Retinoblastomgens, eines Antionkogens) kontrolliert. E2F begünstigt die Expression mehrerer an der Replikation der DNA beteiligter Gene. Außerdem erhöht es die Synthese der Cycline E und A, die den

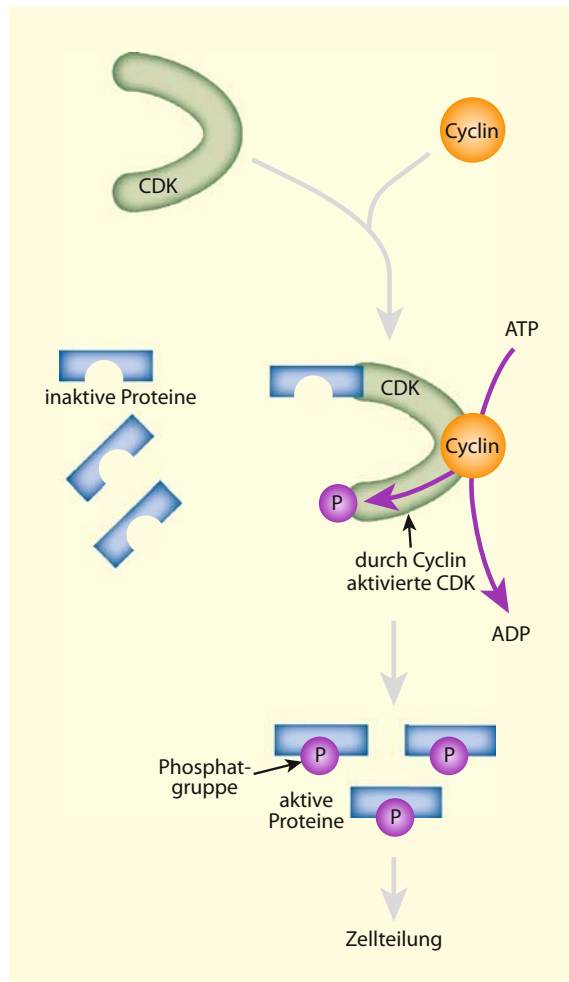


18.2 Der eukaryotische Zellzyklus: Teilung oder Differenzierung

Der Zellzyklus besteht normalerweise aus den vier Phasen G₁, S, G₂ und M. Unter bestimmten Bedingungen kann sich eine Zelle jedoch, statt von der G₁- in die S-Phase überzugehen, differenzieren und in die G₀-Phase eintreten. Differenziert sich die Zelle nicht, so erhält sie ein Signal von Cyclin D und E, tritt in die S-Phase ein und repliziert ihre DNA. Nach etwa fünf Stunden löst ein weiteres Signal von Cyclin A den Übergang der Zelle in die G₂-Phase aus. Anschließend wird Cyclin B aktiv, und die Zelle beginnt mit der Mitose und teilt sich.

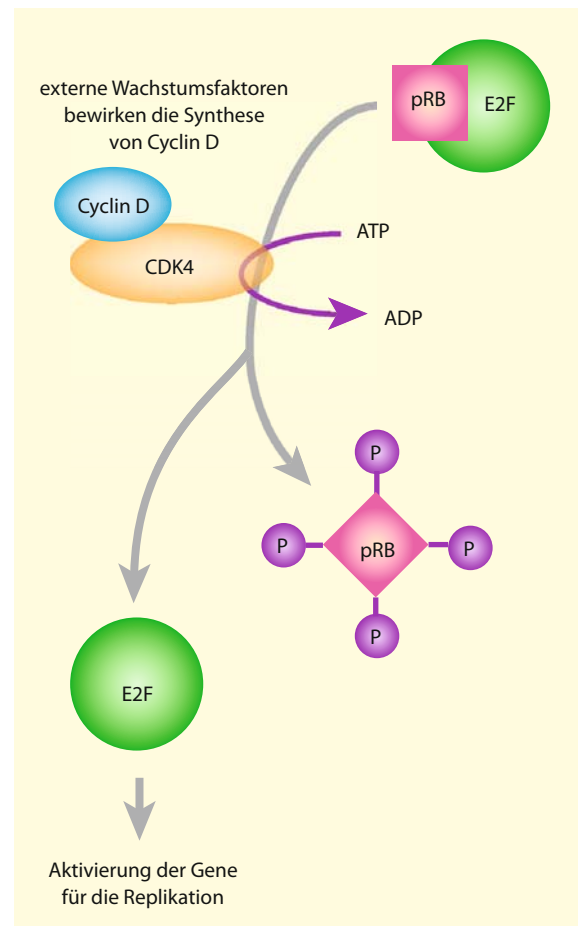
Zellzyklus nach der G_1 -Phase steuern (Abb.18.4). Durch Bindung an pRB wird E2F inaktiviert, bis die Zelle von außen ein Signal erhält. Externe **Wachstumsfaktoren** bewirken die Synthese von Cyclin D. Dieses aktiviert CDK4, die wiederum pRB phosphoryliert. Das phosphorylierte pRB setzt E2F frei, der dann seine Zielgene aktivieren kann. Auf der negativen Seite dieses Regulationssystems dominiert das Protein p53 (s. weiter unten).

In eukaryotischen Zellen wird der Ablauf der aufeinanderfolgenden Phasen der Zellteilung durch Cycline kontrolliert. In jeder Phase erreicht die Zelle einen Kontrollpunkt und stellt sicher, dass sich alle Proteine und die DNA in der richtigen Position befinden, bevor der Übergang in die nächste Phase erfolgt. E2F und pRB kontrollieren den Übergang von der G_1 - in die S-Phase.



18.3 Cycline entfalten ihre Wirkung über Cyclin-abhängige Kinasen

Bevor eine Zelle in eine neue Phase des Zellzyklus eintreten kann, muss zunächst das entsprechende Cyclin einen Komplex mit einer Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) eingehen. Durch Addition einer Phosphatgruppe aus ATP wird der Cyclin/CDK-Komplex aktiviert. Der aktive Komplex überträgt dann die Phosphatgruppe auf andere Proteine, die an der Zellteilung beteiligt sind.



18.4 Kontrolle des Übergangs von der G_1 -Phase in die S-Phase durch pRB und E2F

Am Ende der G_1 -Phase muss zur Initiation des Übergangs in die S-Phase Cyclin D aktiviert werden. Dazu muss Cyclin D an seinen Partner CDK4 binden. Nach Bildung dieses Cyclin/CDK4-Komplexes wird ATP hydrolysiert und eine Phosphatgruppe auf den Komplex übertragen. Diese Phosphatgruppe wird dann weiter transferiert auf pRB, das daraufhin E2F freisetzt. Dadurch können nun die zur Initiation der DNA-Replikation erforderlichen Gene transkribiert werden.

Die Zellteilung reagiert auf externe Signale

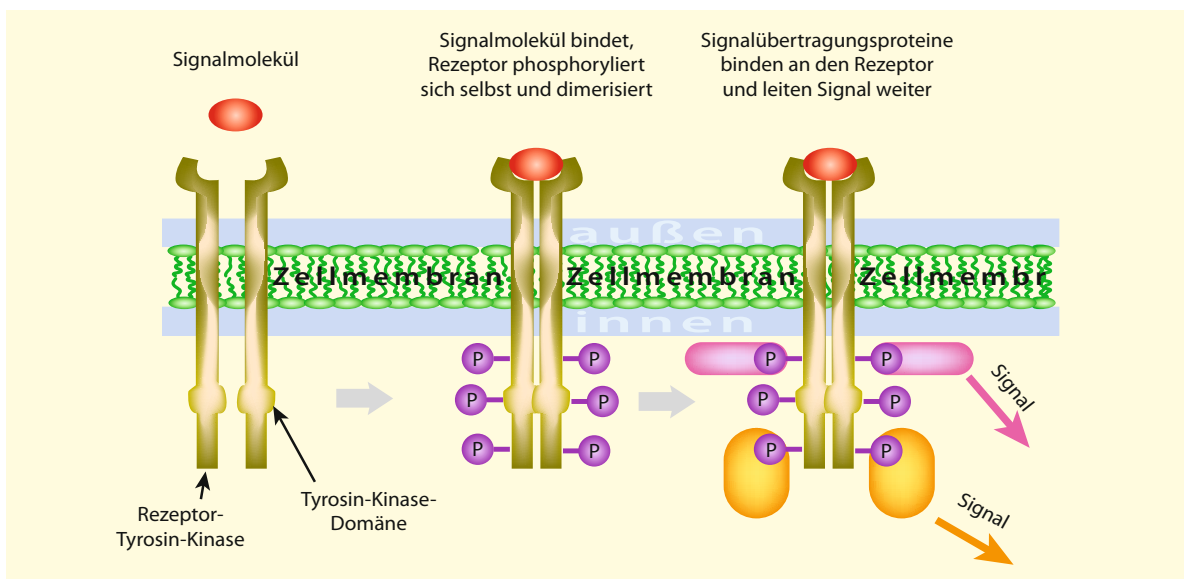
Es gibt eine große Zahl von extrazellulären Wachstumsfaktoren und Hormonen. Viele davon wirken spezifisch auf bestimmte Zellen oder Gewebe ein. So stimuliert beispielsweise der epidermale Wachstumsfaktor EGF (engl. *epidermal growth factor*) Epithelzellen und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF (engl. *fibroblast growth factor*) Muskelzellen. Die Wachstumsfaktoren werden von spezifischen Rezeptoren an der Zelloberfläche gebunden. Durch diese Bindung wird die innere Domäne des Rezeptors aktiviert. Das ist häufig selbst eine Proteinkinase, oder die Domäne aktiviert eine assoziierte Proteinkinase (Abb. 18.5). Im typischen Fall aktiviert die Proteinkinase ein Protein der Ras-Familie, und dieses stimuliert wiederum eine Phosphorylierungskaskade. Diese besteht aus drei **Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen)**. MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert MAPK-Kinase (MAPKK), die wiederum MAP-Kinase (MAPK) aktiviert. Schließlich phosphoryliert MAPK Transkriptionsfaktoren, die zu einem frühen Zeitpunkt der Zellteilung

benötigte Gene aktivieren, darunter auch das Gen für Cyclin D.

Die Zellteilung wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Diese senden über eine Kaskade aus Proteinkinasen ein Signal von außerhalb der Zelle zum Zellkern.

Gene, die bei Krebs eine Rolle spielen

Bei den Genen, die bei Krebs eine Rolle spielen, ist es wichtig, grundsätzlich zwei verschiedene Typen zu unterscheiden. Einige Gene beeinflussen die Anfälligkeit einer Person für Krebs. Eine erhöhte Anfälligkeit kann genau wie jede andere genetische Störung erblich sein (s. weiter unten). Zusätzlich sind noch zwei Klassen von Genen (infolge von somatischen Mutationen) direkt an der Entstehung von Krebs beteiligt. Das sind die **Onkogene** und die **Tumorsuppressorgene** oder **Antionkogene**.



18.5 Aktivierung des Wachstumsfaktor-Rezeptors

Wachstumsfaktor-Rezeptoren weisen drei Domänen auf: die extrazelluläre Bindungsstelle, die Transmembranregion und die intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne. Wenn an die extrazelluläre Domäne ein Signalmolekül bindet, binden zwei Rezeptormoleküle aneinander. Dies bewirkt, dass die Tyrosin-Kinase-Domänen einander durch gegenseitige Phosphorylierung aktivieren. Mit den Phosphatgruppen werden dann nachgeschaltete Signalmoleküle aktiviert, die wiederum die Transkriptionsfaktoren für das Zellwachstum aktivieren.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Onkogenen und Antionkogenen beruht auf der Tatsache, dass Tiere diploid sind und zwei Kopien jedes Gens besitzen. Onkogene sind krebserregende Gene. Mutierte Onkogene begünstigen die Bildung von Krebszellen. Mutationen in Onkogenen sind dominant. Daher reicht eine einzelne onkogenische Mutation in nur einem Allel eines Gens aus, um sich auszuwirken. Die zweite Wildtypkopie des Gens kann diesen Defekt nicht kompensieren.

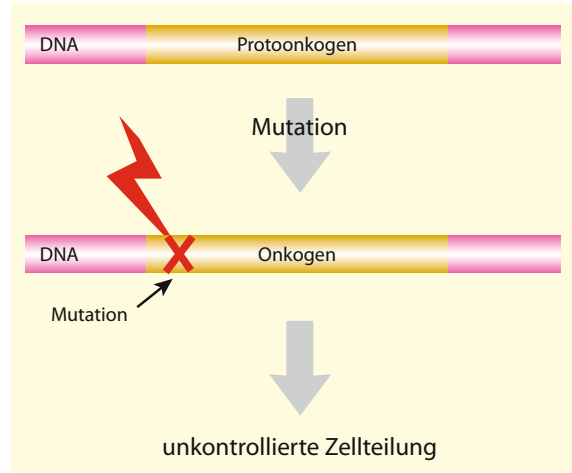
Tumorsuppressorgene üben dagegen einen negativen Effekt auf die Entwicklung von Krebs aus. Wie ihr Name andeutet, unterdrücken sie normalerweise die Teilung von Krebszellen. Damit Krebs wachsen kann, müssen beide Kopien eines Tumorsuppressorgens durch eine Mutation inaktiviert sein. Eine Mutation in nur einem Allel eines Tumorsuppressorgens wirkt sich nicht aus, denn es handelt sich um rezessive Mutationen.

Weil Krebs auf Mutationen zurückzuführen ist, werden die Techniken zur Genomanalyse auch häufig zur Analyse von Krebs auf genetischer Ebene eingesetzt. Dazu gehören beispielsweise DNA-Sequenzierung, PCR und Microarrays, die bereits in den Kapiteln 4 und 8 beschrieben wurden.

Zwei Typen von Genen können Krebs auslösen: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Onkogene bilden sich, wenn in einem Protoonkogen eine einzelne dominante Mutation erfolgt. Tumorsuppressorgene schützen Zellen vor Krebs; wenn beide Kopien dieser Gene mutiert sind, ist dieser Schutz der Zelle aufgehoben.

Onkogene und Protoonkogene

Erstmals entdeckt hat man Onkogene bei krebserregenden Viren, sie finden sich jedoch auch in allen normalen Zellen. Das ursprüngliche, nichtmutierte Wildtypallel eines Onkogens bezeichnet man bisweilen als **Protoonkogen**. Das Wildtyp-Protoonkogen fördert Wachstum und Teilung der Zelle. Die Zellteilung muss während der Entwicklung eines vielzelligen Organismus streng kontrolliert werden. Hat ein Organ oder Gewebe seine richtige Größe erreicht, sollte das Wachstum eingestellt werden – mit anderen Worten, die Zellen sollten aufhören, sich zu



18.6 Onkogene sind mutierte Allele von Protoonkogenen

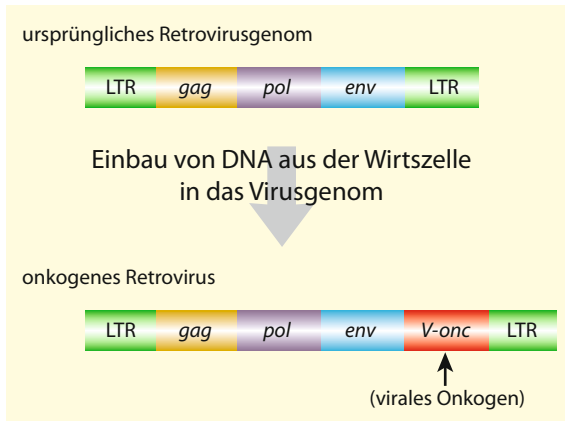
Die menschliche DNA enthält als Protoonkogene bezeichnete Gene, die normalerweise die Zellteilung kontrollieren. Tritt in diesen Protoonkogenen eine Mutation auf, kann die Zelle ihre Teilung nicht mehr kontrollieren, und es bildet sich schließlich ein Tumor.

teilen. Natürlich sind Mutationen an Genen, die die Zellteilung kontrollieren, potenziell sehr gefährlich. Bei diesen mutierten Versionen handelt es sich um die krebserregenden Onkogene (Abb. 18.6).

Die Genome krebserregender Viren enthalten ebenfalls Onkogene. Diese Onkogene stammen jedoch ursprünglich aus dem Genom der Wirtszellen, die das Virus infiziert. Bestimmte Virustypen nehmen gelegentlich zelluläre DNA auf und bauen diese in ihr Virusgenom ein. Wenn die aufgenommene DNA ein Onkogen enthält, entsteht ein krebserregendes **onkogenes Virus** (Abb. 18.7). Von Viren stammende Onkogene bezeichnet man als virale Onkogene (geschrieben **v-onc**) und unterscheidet sie so von zellulären Onkogenen (**c-onc**). Man kennt zwar einige wenige Krebsviren, die meisten beim Menschen auftretenden Formen von Krebs gehen jedoch nicht auf Viren zurück, sondern auf Neumutationen zellulärer Protoonkogene zu Onkogenen.

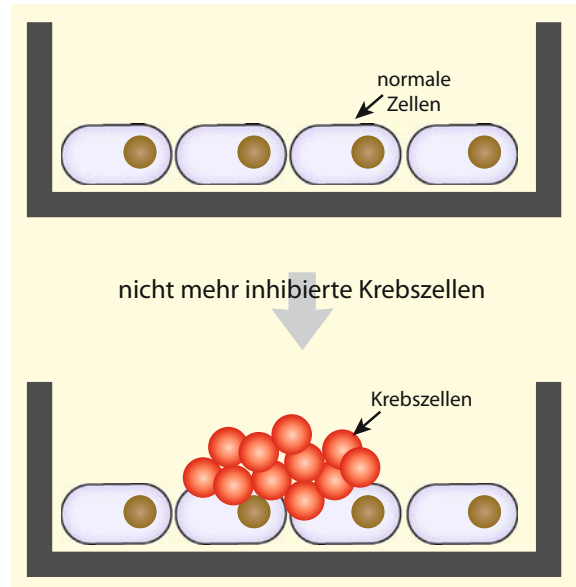
Onkogene sind mutierte Formen von Protoonkogenen; dies ist die Bezeichnung für das ursprüngliche, nichtmutierte Gen.

Onkogene Viren erlangen Onkogene von einer Wirtszelle und übertragen das Onkogen dann bei der Infektion auf andere Wirte.



18.7 Aufnahme viraler Onkogene aus Wirtszellen

Der Vergleich eines ancestralen viralen Genoms mit seinem heutigen Gegenstück zeigt, dass neue Gene hinzugekommen sind. In diesem Beispiel hat das Virus das *v-onc*-Gen aufgenommen, eine Kopie eines Protoonkogens aus der Wirtszell-DNA. Wenn dieses Virus in einen neuen Wirt eindringt, kommt es durch eine Überexpression des viralen Onkogens beim Wirt zu einer unkontrollierten Zellteilung, durch die letztendlich Krebs entsteht.



18.8 Bei Krebszellen geht die Kontaktthemmung verloren

Normale Zellen wachsen in einer Zellkultur, bis sie auf allen Seiten mit benachbarten Zellen in Kontakt kommen. Dann stellen sie die Teilung ein. Bei Mutationen, welche die Gene für die Zellteilung betreffen, teilen sich die Zellen weiter und bilden in der Kulturschale kleine Mikrotumoren.

Nachweis von Onkogenen durch Transformation

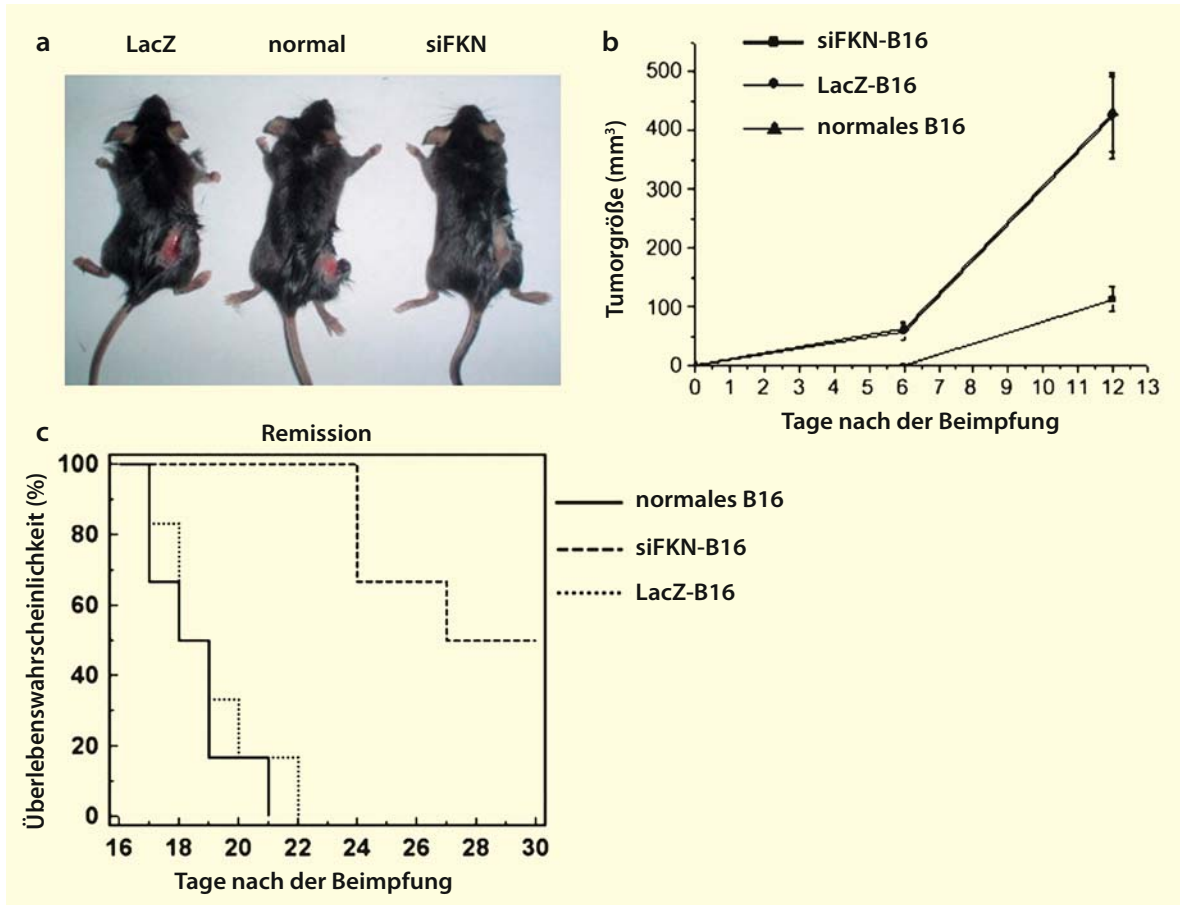
Wird aus Krebszellen DNA extrahiert und in gesunde Zellen eingebaut, so können sich diese in Krebszellen verwandeln. Man spricht in diesem Fall von **Transformation**. (Hierbei ist zu beachten, dass der Begriff *Transformation* in der Genetik von Bakterien eine verwandte, aber andere Bedeutung hat; dort bezeichnet man damit Aufnahme und Einbau von Fremd-DNA.) Besteht der Verdacht auf das Vorhandensein eines Onkogens, so kann man dies überprüfen, indem man zu geeigneten Zellen in Kultur eine Probe der verdächtigen DNA hinzugibt.

Normale tierische Zellen bilden in einer Zellkultur eine dünne, einlagige Zellschicht auf der Oberfläche des Kulturmediums. Normalerweise überwachsen sie einander nicht und bilden auch keine Zellhaufen (Abb. 18.8). Ist die gesamte verfügbare Oberfläche der Kulturschale bedeckt und jede Zelle steht auf allen Seiten in direktem Kontakt mit Nachbarzellen, so wird die Zellteilung eingestellt. Man spricht von der sogenannten **Kontaktthemmung**. Im Gegensatz dazu wachsen Krebszellen ungehemmt:

Sie teilen sich weiter und aggregieren zu Zellhaufen (s. Abb. 18.8). Solche sichtbaren kleinen Zellhaufen bilden sich, wenn man normalen Zellen in einer Zellkultur DNA mit einem Onkogen beifügt. Man könnte diese Zellhaufen als Miniaturtumoren betrachten. Injiziert man Zellen aus diesen Haufen in Versuchstiere wie Mäuse, so entwickeln diese einen echten Tumor (Abb. 18.9).

Eine damit verwandte Eigenschaft von Krebszellen ist ihr *von einer Verankerung unabhängiges* Wachstum. Anders als die meisten normalen Zellen können Krebszellen auch ohne die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix wachsen und sich teilen. Als Folge davon können Krebszellen wandern und sich an „falschen“ Stellen im Körper vermehren. Dieses Verhalten tritt besonders bei malignen (im Gegensatz zu benignen) Tumoren zutage.

Normale Zellen bilden *in vitro* eine einlagige Schicht in der Kulturschale und stellen dann das Wachstum ein. Krebszellen wachsen weiter und werden durch Kontakt nicht in ihrem Wachstum gehemmt.



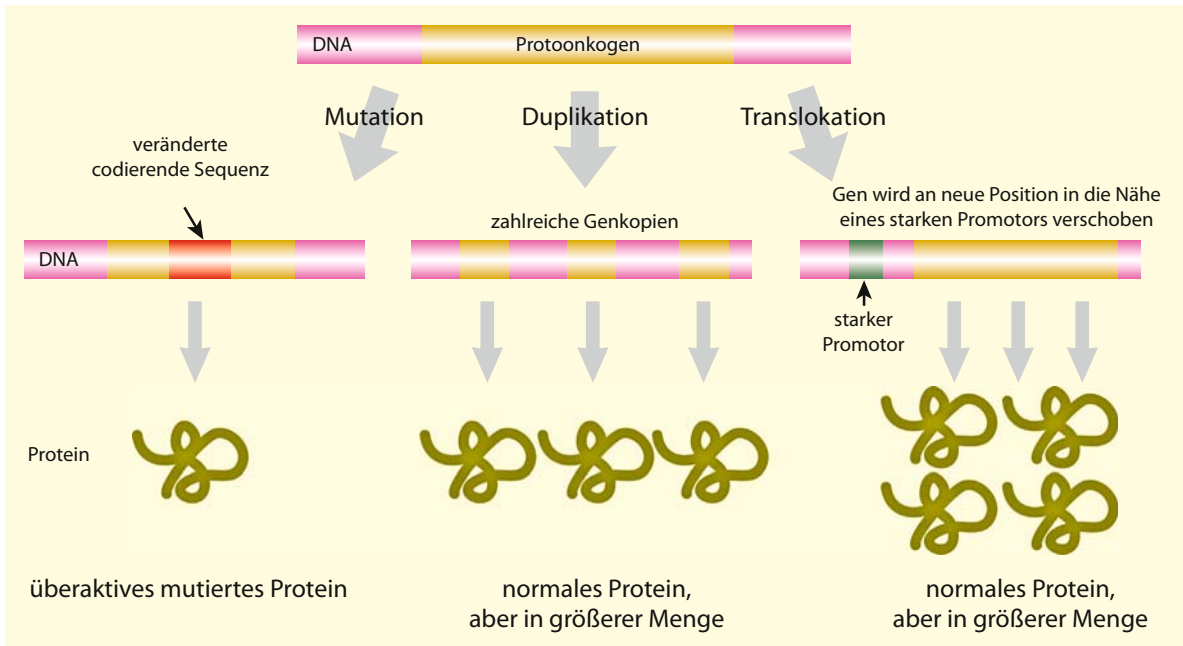
18.9 Menschliche Krebszellen verursachen Tumoren bei Mäusen

Zellen der Melanomzelllinie B16-F0 von Mäusen wurden *in vitro* mit DMEM-Medium und fetalem Rinderserum kultiviert. Anschließend injizierte man C57BL/6-Mäusen 1×10^6 lebende Zellen in die rechte Flanke. Innerhalb von drei Wochen entwickelten sich Tumoren mit Blutgefäßen (mittlere Maus). Bei der Kontrollmaus links wurden die B16-F0-Zellen vor der Beimpfung der Maus mit einem Plasmidvektor transfiziert, der das Gen für β -Galactosidase enthielt. Bei der Maus rechts erfolgte eine Transfektion mit einem Plasmidvektor mit einer siRNA (*short interfering RNA*), welche die Expression von CX₃CL1/Fraktalkin, einem Zelladhäsionsmolekül, blockiert. Bei Blockierung des Adhäsionsproteins ist der Tumor deutlich kleiner und viel weniger mit Gefäßen durchzogen. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung aus: Ren, Chen, Tian, Wei (2007) *Biochem Biophys Res Commun* 364: 978–984.

Mutationstypen, durch die Onkogene entstehen

Mutationen, durch die Onkogene entstehen, sind dominant und resultieren in einer vermehrten Zellteilung. Das liegt daran, dass die onkogenen Mutationen nicht auf einen Verlust an Aktivität zurückzuführen sind, sondern auf eine erhöhte Aktivität des von dem Onkogen codierten Produkts. Solche Funk-

tionsgewinnmutationen können entstehen, wenn das von dem Protoonkogen codierte Protein verändert oder seine Produktion gesteigert wird (Abb. 18.10). Infolgedessen kann die Wildtypkopie des Protoonkogens die Wirkung des Onkogens nicht aufheben. Wie alle anderen Gene enthält ein Protoonkogen eine regulatorische Region plus eine strukturelle Region, die für ein Protein codiert. Einige Onkogene entstehen durch Veränderungen der regulatorischen Region, die eine erhöhte Genexpression bewirken. Andere gehen auf Mutationen im strukturellen Anteil des



18.10 Onkogene Mutationen bewirken eine erhöhte Aktivität

Drei verschiedene mögliche Mutationen können bewirken, dass aus Protoonkogenen Onkogene werden. Erstens kann durch eine Mutation die eigentliche Proteinsequenz verändert werden, wodurch ein überaktives Protein entsteht. Zweitens kann das gesamte Protoonkogen einmal oder mehrere Male dupliziert werden. Die zusätzlichen Kopien sorgen dann dafür, dass abnormal hohe Mengen Protein produziert werden. Drittens kann das Protoonkogen durch Neuordnungen von Chromosomen in die Nähe eines starken Promotors verschoben werden. Durch diesen neuen Promotor erhöht sich die Genexpression, und es wird mehr Protein synthetisiert.

Protoonkogens zurück, durch die ein Protein mit erhöhter Aktivität synthetisiert wird.

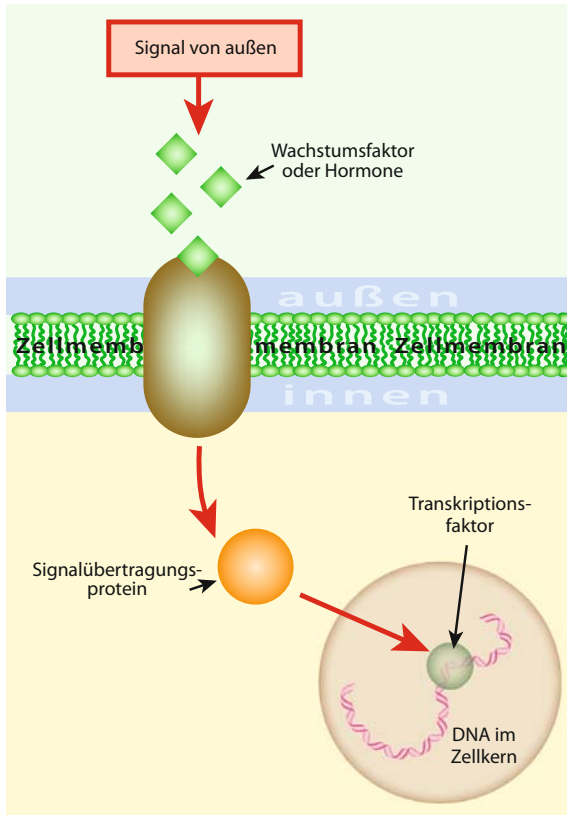
Der Weg zur Aktivierung von Zellwachstum und Zellteilung verläuft über mehrere Stufen; die daran beteiligten Proteine werden durch Protoonkogene codiert (Abb. 18.11). Es ist nicht überraschend, dass Mutationen, die eine Überaktivierung einer dieser Proteinkomponenten zur Folge haben, aus Protoonkogenen Onkogene machen. An der Zellteilung sind im Wesentlichen folgende Komponenten beteiligt:

1. Wachstumsfaktoren: Das sind Proteine oder andere chemische Botenstoffe, die im Blut zirkulieren und Signale für eine Aktivierung des Wachstums an die Zelloberfläche übertragen.
2. Zelloberflächenrezeptoren: Diese Proteine finden sich in der Zellmembran; sie erhalten dort chemische Botschaften von außerhalb der Zelle. Sie leiten das Signal weiter, oftmals durch Aktivierung weiterer Proteine wie G-Proteine.
3. Signaltransduktionsproteine: Diese leiten das Signal von außerhalb der Zelle weiter zu Proteinen

oder Genen, die an der Zellteilung beteiligt sind. Bei vielen dieser Proteine handelt es sich um Proteinkinasen, die andere Proteine durch Übertragung einer Phosphatgruppe aktivieren oder inaktivieren.

4. Transkriptionsfaktoren: Diese Proteine binden an Gene im Zellkern und schalten diese an. Das führt zur Synthese neuer Proteine – im Gegensatz zur Aktivierung der bereits vorhandenen.

Protoonkogene werden zu Onkogenen, wenn eine Mutation die Aktivität des Proteins erhöht, wenn das Gen dupliziert wird oder wenn eine Mutation am Promotor die Expression des Proteins erhöht. Zellwachstum wird durch einen Wachstumsfaktor signalisiert, der an einen Zelloberflächenrezeptor bindet und diesen aktiviert. Der intrazelluläre Anteil des Rezeptors aktiviert intrazelluläre Proteine, die zum Zellkern wandern. Im Zellkern aktivieren diese Proteine einen Transkriptionsfaktor, der die Gene für das Wachstum anschaltet.

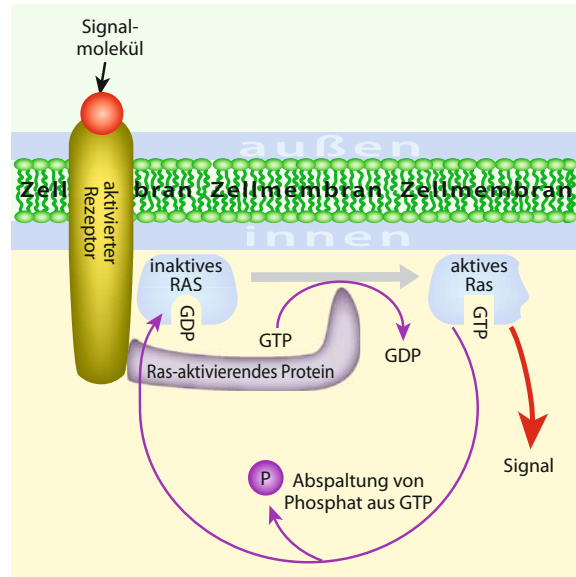


18.11 Komponenten, die das Wachstum und die Teilung von Zellen fördern

Damit ein Signal für das Zellwachstum ausgeführt wird, sind mehrere Schritte erforderlich. Erstens ist an dem Wachstumssignal die Produktion von Wachstumsfaktoren beteiligt. Diese binden an einen Zelloberflächenrezeptor und aktivieren diesen. Dieser aktiviert wiederum verschiedene intrazelluläre Proteine, die das Signal von der Zellmembran in den Zellkern übertragen. Im Zellkern aktiviert ein Transkriptionsfaktor Gene, die für Wachstum und Teilung der Zelle benötigt werden.

Das *ras*-Onkogen – Überaktivierung des Proteins

Ras-Proteine übertragen Signale für die Zellteilung beim Menschen, bei Fliegen und sogar bei Hefezellen (Abb. 18.12). Wachstumssignale von außerhalb werden von Rezeptoren an der Zelloberfläche aufgenommen. Die aktivierten Rezeptoren übertragen das Signal auf das intrazelluläre Ras-Protein. Nach Erhalt eines Signals bindet normales Ras-Protein



18.12 Funktion des Ras-Proteins

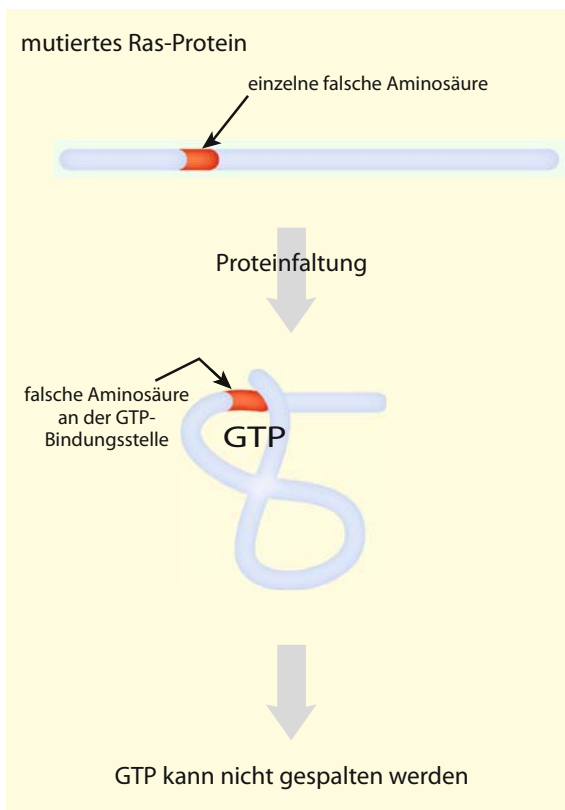
Wenn ein Zelloberflächenrezeptor ein Signal zum Wachstum erhält, überträgt er dieses auf das Ras-Protein. Das aktivierte Ras bindet an GTP und übermittelt das Wachstumssignal an den Zellkern. Nach Übermittlung des Signals wird GTP zu GDP hydrolysiert, und Ras wird wieder inaktiviert.

Guanosintriphosphat (GTP) und geht in die Signalübertragungsform über. Nach Übertragung einer kurzen Signalfolge spaltet Ras das GTP in Guanosindiphosphat und Phosphat und geht wieder in die inaktive Form über. Die krebsauslösende Form des Ras-Proteins ist permanent aktiv – sie bleibt in der Signalübertragungsform und spaltet GTP nicht. Daher wird die Zelle kontinuierlich mit Signalen überflutet, die die Zellteilung vorantreiben, auch wenn von außen gar keine Signale ankommen.

Das ***ras*-Onkogen** entsteht durch den Austausch einer einzelnen Base in der Strukturregion des Gens. Dieser führt zur Veränderung einer einzelnen Aminosäure im codierten Protein (Abb. 18.13). Die meisten *ras*-Mutationen verändern die Aminosäure an Position 12; andere betreffen die Positionen 13 oder 61. Nur wenige sehr spezifische Mutationen können aus dem Protoonkogen ein *ras*-Onkogen machen. Die dreidimensionale Struktur des Ras-Proteins konnte durch Röntgenkristallographie ermittelt werden. Die wenigen, durch onkogene Mutationen veränderten Aminosäurereste sind alle direkt an der Bindung und Spaltung von GTP beteiligt. Eine

Überaktivierung von Ras hat eine unkontrollierte Zellteilung zur Folge und damit möglicherweise den Beginn von Krebs. Bei Lungen-, Dickdarm-, Bauchspeicheldrüsen- und Schilddrüsenkrebs hat man häufig Mutationen von *ras* festgestellt und im Detail analysiert.

Ras wird zu einem Onkogen, wenn durch eine Mutation die Aminosäure an den Positionen 12, 13 oder 61 ausgetauscht wird. Die onkogene Form des Ras-Proteins sendet kontinuierlich Signale zum Wachstum an den Zellkern. Normales Ras-Protein signalisiert nur dann Wachstum, wenn ein Wachstumsfaktor an die Oberflächenrezeptoren der Zelle bindet.



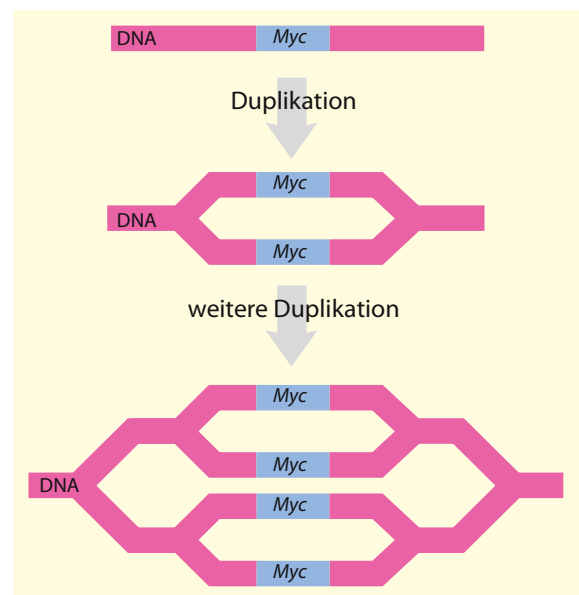
18.13 Mutationen, durch die das *ras*-Onkogen entsteht, sind hoch spezifisch

Damit ein normales Protoonkogen in das *ras*-Onkogen übergeht, müssen einzelne Aminosäuren ausgetauscht werden. Dieser Aminosäureaustausch verhindert die Hydrolyse von GTP durch Ras. Daher befindet sich das Protein permanent in seiner signalübertragenden Form.

Das *myc*-Onkogen – Überproduktion des Proteins

Manche Onkogene sind auf Mutationen zurückzuführen, welche die Struktur eines Proteins wie Ras ändern. Doch nicht immer wird ein überaktives mutiertes Protein synthetisiert. Bei vielen anderen Onkogenen kommt es zu Veränderungen, durch die eine sehr viel größere Menge des Proteins produziert wird, das Protein selbst jedoch unverändert bleibt.

Ein sehr bekanntes Beispiel ist das ***myc*-Onkogen**. Es codiert für einen Transkriptionsfaktor, der für das Anschalten mehrerer anderer an der Zellteilung beteiligter Gene zuständig ist. Eine Überdosis an **Myc-Protein** kann auf zwei Wegen entstehen. Einige *myc*-abhängige Formen von Krebs resultieren aus chromosomalen Veränderungen, im Zuge derer das *myc*-Gen viele Male dupliziert wird. Anstelle der normalen zwei Kopien können aufgrund einer fehlerhaften Duplikation des DNA-Abschnitts, der

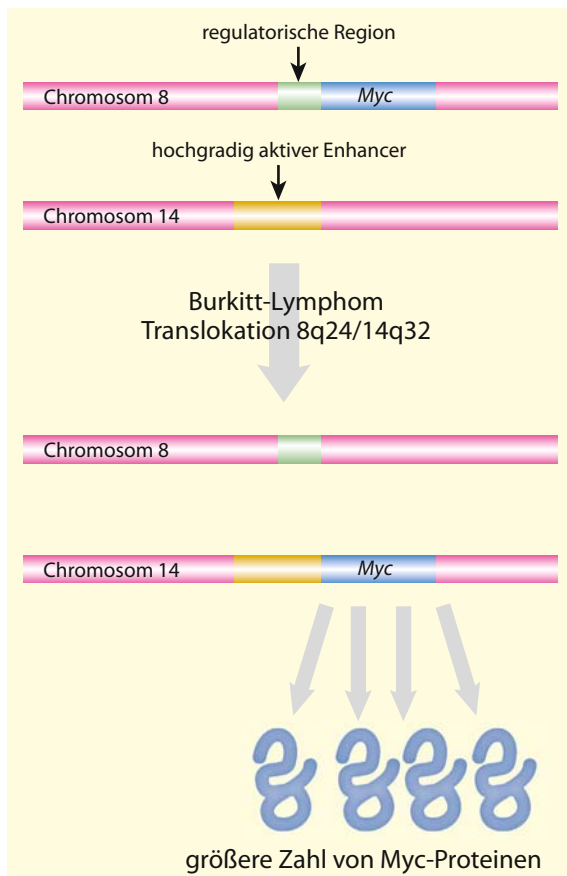


18.14 Überproduktion des Myc-Proteins durch Gendosiseffekt

Normalerweise ist das Myc-Gen in zwei Kopien vorhanden. Aufgrund einer aberranten Chromosomenreplikation kann es zu einer Duplikation des *myc*-Gens kommen. Ist dies der Fall, so steigt die Zahl der *myc*-Onkogene exponentiell an. Da alle diese Kopien exprimiert werden, nimmt auch die Menge des Myc-Proteins entsprechend zu, und es entwickelt sich Krebs.

das *myc*-Gen trägt, 50 bis 100 Kopien vorhanden sein (Abb. 18.14). Dadurch erfolgt auch eine Überproduktion des Myc-Proteins in der 50- bis 100-fachen Menge.

Andererseits kann die Kopienzahl des *myc*-Gens auch unverändert bleiben, aber dessen Regulation kann sich verändern. Beim Burkitt-Lymphom, einer seltenen chromosomalen Translokation, werden Abschnitte zweier nicht verwandter Chromosomen ausgetauscht. Dadurch kommt es zu einer Trennung des *myc*-Strukturgens von seiner eigenen regulatorischen Region und zur Fusion mit einem hochgradig aktiven Promotor eines anderen Gens (Abb. 18.15). Daraufhin wird das Myc-Protein kontinuierlich in beträchtlichen Mengen produziert und ist nicht so strikt reguliert wie zuvor.



18.15 Überproduktion des Myc-Proteins durch veränderte Promotoren

Durch chromosomale Translokation des *myc*-Onkogens kann es zur Fusion des Strukturanteils des Gens mit einem hochgradig aktiven Promotor kommen. Dadurch wird sehr viel mehr Protein synthetisiert.

Mutationen des *myc*-Gens gehören zu den häufigsten Krebsformen von Säugetieren. Bei den meisten Krebsformen des Menschen kommt es zu einer Überproduktion von Myc – wie häufig, ist jedoch je nach Tumortyp ausgesprochen unterschiedlich. Mutationen am *myc*-Gen kommen insbesondere bei weiter fortgeschrittenen Stadien vieler Krebsformen wie Lungen-, Brust- und Eierstockkrebs vor.

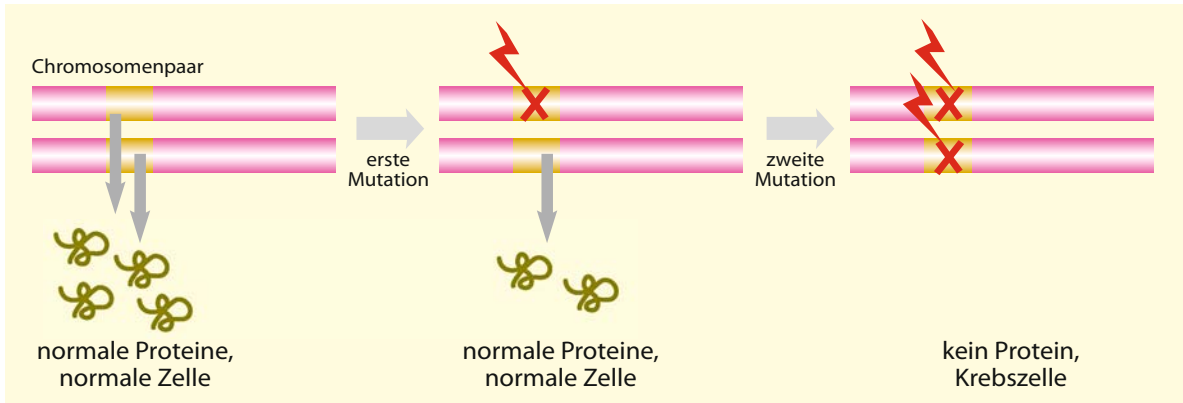
Myc ist ein häufiges Onkogen. Bei einigen Krebsformen steigt die Zahl der *myc*-Gene aufgrund einer fehlerhaften DNA-Replikation, bei anderen gelangt das *myc*-Gen durch eine Translokation in die Nähe eines starken Promotors. Beide Mutationen erhöhen die Menge an Myc-Protein, was ein zu starkes Zellwachstum zur Folge hat.

Tumorsuppressorgene oder Antionkogene

Tumorsuppressorgene oder Antionkogene unterdrücken normalerweise die Zellteilung. Folglich müssen beide Kopien inaktiviert sein, damit es zu einem krebsartigen Wachstum kommt. Eine Mutation in nur einer Kopie eines Tumorsuppressorgens wirkt sich nicht aus. Es handelt sich also um rezessive Mutationen. Wurden beide Allele eines Gens durch Nullmutationen inaktiviert, spricht man vom sogenannten **nullizygoten** Zustand. Die beiden häufigsten Antionkogene sind Rb und p53 (s. weiter unten). Bei fast allen menschlichen Tumoren sind entweder Rb oder p53, oft aber auch beide inaktiviert.

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie es zu einer Inaktivierung beider Kopien eines Gens kommen kann (Abb. 18.16). Erstens können während der Teilung der Zellen, die den Körper bilden, zwei somatische Mutationen nacheinander auftreten. Zuerst wird eine Kopie des Gens inaktiviert, dann trifft eine zweite Mutation die zweite Kopie desselben Gens. Das scheint zwar ziemlich unwahrscheinlich, passiert jedoch gelegentlich – genügend Zeit und eine ausreichend hohe Zahl von Zellen vorausgesetzt.

Der zweite Weg ist häufiger. Die erste Mutation erfolgt in einer Kopie des Gens in einer Keimbahnzelle eines Vorfahren. Wird diese defekte Kopie weitervererbt, ist bei den Neugeborenen bereits von Geburt an in jeder Zelle eine Kopie des Gens in-



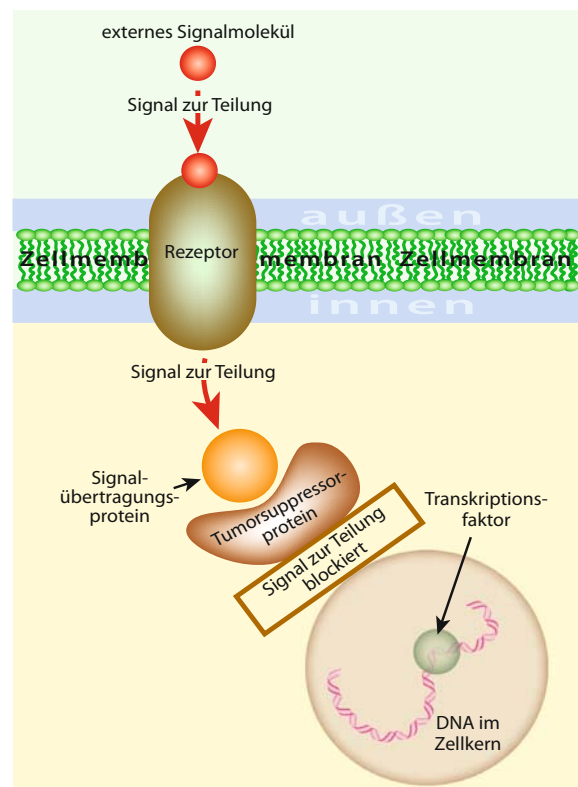
18.16 Mutationen in Tumorsuppressorgenen sind rezessiv

Im Normalfall sind zwei Wildtyp-Antionkogene vorhanden. Um das Antionkogen vollständig zu inaktivieren, müssen zwei Mutationsereignisse auftreten.

aktiviert. Nun kann es während der Zellteilung zu einer somatischen Mutation kommen, durch die die zweite Kopie inaktiviert wird. Mit anderen Worten, ein defektes Allel wird geerbt, das andere entsteht durch eine somatische Mutation. Individuen, die ein einzelnes defektes Antionkogen erben, bekommen nicht immer Krebs. Sie erben lediglich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Krebs.

Dieses Schema gilt für ein Dutzend oder mehr Tumorsuppressorgene. Einige davon sind an einer Reihe von Krebsformen beteiligt, etwa das **Retinoblastomgen (Rb-Gen)**. Dieses Gen wurde zunächst bei einer seltenen Krebsform der Retina (Netzhaut) des Auges entdeckt und nach dieser benannt, es spielt aber auch bei vielen anderen Tumoren eine Rolle. Weitere Antionkogene sind sehr gewebespezifisch. Eine Inaktivierung beider Kopien löst Krebs in einem bestimmten Organ aus, wie beispielsweise das Wilms-Tumor-Gen, das für einen bestimmten Nierenkrebs verantwortlich ist.

Antionkogene codieren für Proteine, die normalerweise das Wachstum hemmen oder die Zellteilung verhindern. Einige das Wachstum und die Teilung aktivierende Faktoren kommen von außerhalb der Zelle. Anders ausgedrückt: Im Blut zirkulierende Hormone regulieren Wachstum und Entwicklung. Einige von Antionkogenen codierte Proteine sind daran beteiligt, diese externen Hormonsignale zu erkennen und ihre Wirkung auf die Zellteilung zu unterbinden (Abb. 18.17). Ein Beispiel hierfür ist das PTEN-Protein; es wirkt als Antagonist zu Insulinsignalen und schränkt auf diese Weise Zellwachstum und Proteinsynthese ein.



18.17 Externes Signal für die Zellteilung

Da wachstumsfördernde Signale häufig im Blut zirkulieren, sind die meisten Zellen des Körpers dem Wachstumssignal ausgesetzt. Es teilen sich jedoch nur einige Zellen, weil von Antionkogenen codierte Proteine die Übertragung des externen Reizes blockieren. Antionkogenproteine können an Signalübertragungsproteine binden und dadurch verhindern, dass diese Transkriptionsfaktoren aktivieren.

In jüngerer Zeit haben sich Hinweise gehäuft, dass einige somatische Zellen zusätzlich zu der externen Kontrolle noch vorprogrammiert sind. Es ist jeweils eine festgelegte Zahl von Zellteilungen erlaubt. Eine Art „innere Generationenuhr“ zählt, wie viele Teilungen noch erlaubt sind; sobald null erreicht ist, werden Wachstum und Teilung eingestellt. Einige Antionkogene sind Teil dieses Systems. Sind sie defekt, so hört die Zelle auf, sich zu teilen. Bei vielen der von Antionkogenen codierten Proteine handelt es sich um DNA-bindende Proteine, häufig mit Zinkfingern.

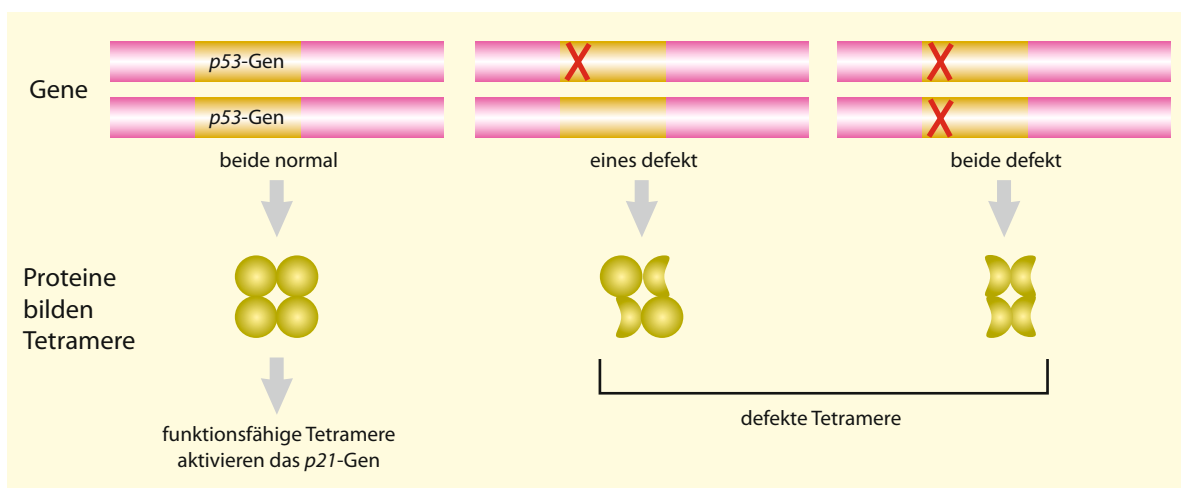
Bei Tumorsuppressorgen muss in beiden Kopien eine Mutation auftreten, damit Krebs entsteht. Manchmal erfolgen beide Mutationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in derselben Zelle. Andere Formen von Krebs entstehen, weil die Nachkommen von einem Elternteil eine mutierte Kopie des Gens erben und bei ihnen somit nur noch eine Mutation stattfinden muss.

Die Antionkogene *p16*, *p21* und *p53*

Das bekannteste Antionkogen des Menschen ist das berühmte **p53-Gen** auf dem kurzen Arm von Chromosom 17. Das **p53-Protein** (auch als TP53

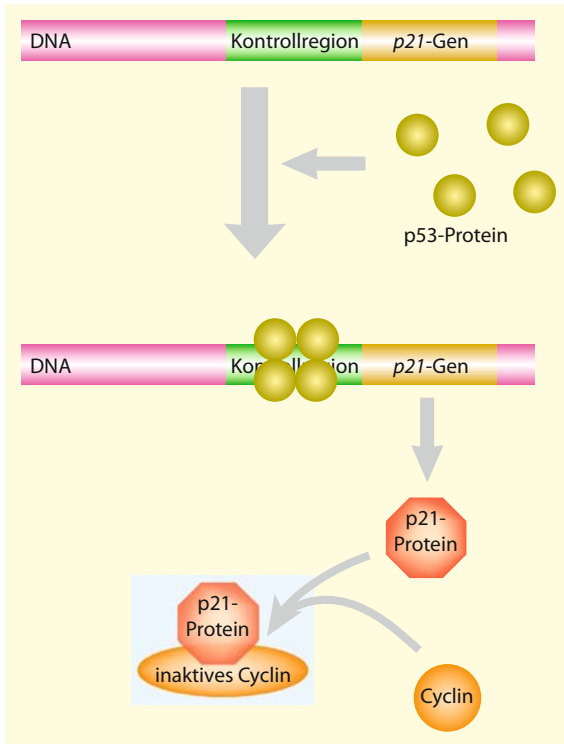
bekannt) ist ein DNA-bindendes Protein und funktioniert zusammen mit den Proteinen p16 und p21 als Notbremse für den Zellzyklus. Das *p53*-Gen ist an zahlreichen verschiedenen Formen von Krebs beteiligt, denn es unterscheidet sich in seinem Verhalten von dem eines Standard-Antionkogens. Mutierte Allele eines typischen Antionkogens sind rezessiv, eine einzelne Mutation ermöglicht also keine Zellteilung. Im Gegensatz dazu zeigt ein einzelnes defektes *p53*-Allel eine solche Wirkung, selbst in Anwesenheit einer zweiten normalen Kopie des Gens. Damit sind die *p53*-Mutationen dominant-negativ. Weit über die Hälfte aller menschlichen Krebsformen gehen mit einem Defekt von *p53* einher.

Ausschlaggebend für dieses aberrante Verhalten ist die Bildung von gemischten Tetrameren. Das vom *p53*-Gen codierte Protein aggregiert zu Vierergruppen (Abb. 18.18). Enthält eine Zelle eine normale und eine defekte Kopie des *p53*-Gens, so produziert sie eine Mischung aus funktionsfähigen und defekten *p53*-Proteinuntereinheiten. Diese aggregieren zu gemischten Tetrameren. Selbst wenn ein Tetramer normale Untereinheiten enthält: Eine defekte Untereinheit reicht aus, um die gesamte Gruppierung zu verkrüppeln. Die Wahrscheinlichkeit, dass aus einem Gemisch von 50 % funktionsfähigen und 50 % defekten Untereinheiten ein Tetramer ausschließlich aus normalen Untereinheiten zusammengesetzt wird, beträgt $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{16}$. Nur ein Sechzehntel der *p53*-Proteintetramere wird also korrekt funk-



18.18 Gemischte Tetramere des p53-Proteins

Mutationen im *p53*-Gen wirken sich nachteilig aus, egal ob nur eine oder beide Kopien mutiert sind. Das p53-Protein entfaltet seine Wirkung als Tetramer. Selbst wenn nur ein Allel die Mutation trägt, sind die meisten entstehenden Tetramere defekt. Nur wenn alle vier Untereinheiten von p53 normal sind, funktioniert p53 korrekt.



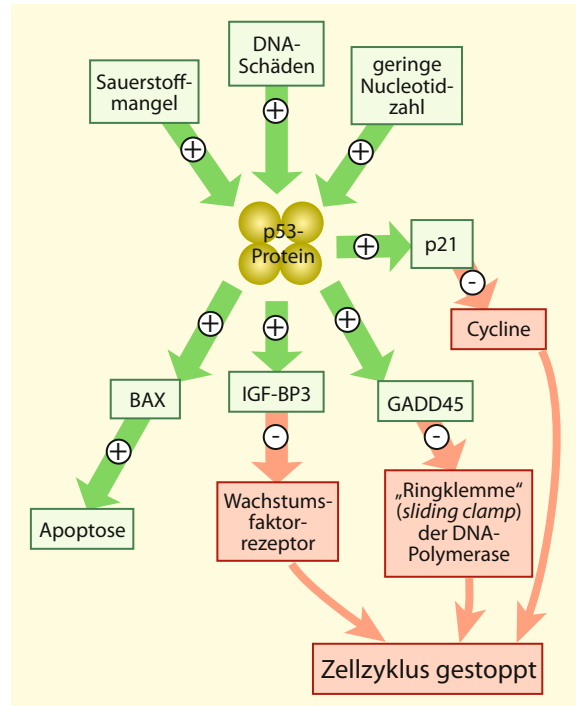
18.19 p53 und p21 blockieren den Zellzyklus

Wenn eine Zelle einen Schaden an der DNA feststellt, bildet das p53-Protein aktive Tetramere, die an die Kontrollregion des p21-Gens binden. p53 stimuliert die Transkription und Translation des p21-Proteins. Das p21-Protein bindet anschließend an die Cycline, inaktiviert diese und verhindert so, dass der Zellzyklus weiter voranschreitet.

nieren, obwohl die Hälfte der einzelnen Proteinuntereinheiten normal ist.

Wenn die DNA einer Zelle auf irgendeine Weise geschädigt ist, aktiviert das normale p53-Protein das Gen für p21. Das **p21-Protein** blockiert dann die Wirkung aller Cycline und führt zum Stillstand des Zellzyklus an der Stelle, an der sich die Zelle gerade befindet, bis der Schaden repariert werden kann (Abb. 18.19). Ähnlich funktioniert das p16-Protein, nur dass es lediglich Cyclin E blockiert. Es stoppt damit den Zellzyklus an dem entscheidenden Punkt kurz vor dem Eintritt in die S-Phase, in der die DNA repliziert wird.

Für die normale Zellteilung ist das p53-Protein nicht erforderlich. Mäuse, bei denen beide Kopien des p53-Gens ausgeschaltet wurden, zeigen zunächst ein normales Wachstum. Nach drei bis vier Mona-



18.20 Die zentrale Rolle von p53

Eine Aktivierung des p53-Proteins ist durch drei Signale möglich: durch einen Mangel an Sauerstoff, durch Schädigung der DNA oder durch eine geringe Zahl von Nucleotiden. Aktiviertes p53 wirkt sich auf viele verschiedene Ziele aus. Bei starken Schäden aktiviert p53 das Bax-Protein und löst den programmierten Zelltod aus. Ansonsten aktiviert p53 das Stoppen des Zellzyklus, indem es das Gen für p21 anschaltet; p21 blockiert wiederum die Cycline. Aktives p53 kann über die Wirkung von GADD45 auch die Synthese durch DNA-Polymerase inhibieren. Zudem bindet aktives p53 an Wachstumsfaktorrezeptoren und blockiert so jegliche weiteren Wachstumssignale.

ten sterben sie jedoch alle an Krebs. p53 kommt die Funktion zu, die Zellteilung in DNA-Notfällen, etwa bei Schädigung durch UV-Strahlung, abzuschalten. Der p53-Weg reagiert auch auf einen Mangel an Nucleotiden oder Sauerstoffknappheit. In schlimmen Fällen kann p53 über das Bax-Protein (s. Kap. 20) den programmierten Zelltod auslösen, statt einfach nur den Zellzyklus zu stoppen (Abb. 18.20). Nach seiner Synthese ist das p53-Protein zunächst inaktiv und kann nicht an seine Erkennungssequenz stromaufwärts von jenen Genen binden, die es kontrolliert. Durch Bindung an eine einzelsträngige DNA oder Phosphorylierung kann es zur Bildung des Tetramers aktiviert werden.

Beide Allele des *p53*-Gens werden zu Protein exprimiert; wenn eines der Allele eine Mutation trägt, ist das *p53*-Tetramer nicht aktiv. Das ist ein Beispiel dafür, dass eine einzelne Mutation in einem Tumorsuppressorgen Krebs auslösen kann.

Das *p53*-Protein verhindert, dass defekte Zellen weiter den Zellzyklus durchlaufen, und bewirkt bei extremer Schädigung sogar den Selbstmord der Zelle durch Apoptose.

3. Inaktivierung (beider Kopien) des *DCC*-Antionkogens;
4. Mutation einer einzelnen Kopie des *p53*-Gens.

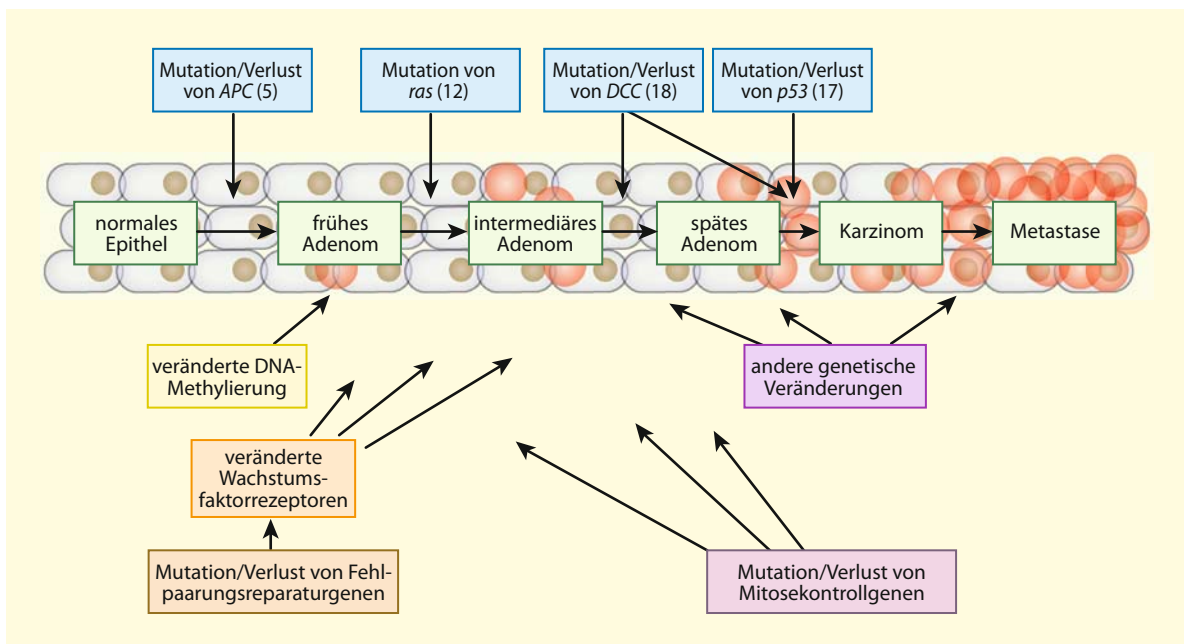
Vor der Entstehung eines voll ausgebildeten Krebstumors sind also ein halbes Dutzend Schritte nötig. Selbst dann bleiben die Krebszellen zunächst alle an derselben Stelle, sodass der Betroffene durch chirurgische Entfernung des Tumors mitunter geheilt werden kann. Auf Dauer bleibt der Krebs aber nicht auf eine Stelle beschränkt. Es knospen Krebszellen ab, die im Körper umherwandern, in andere Gewebe gelangen und dort Sekundärtumoren bilden. Diese nennt man **Metastasen**. Ist dieses Stadium erreicht, ist es praktisch unmöglich, alle Krebszellen aufzuspüren und zu entfernen. Damit sich Krebszellen ausbreiten, sind weitere Mutationen erforderlich, über die man noch nicht genügend weiß. Zu den Folgen dieser Mutationen gehören unter anderem:

1. Verlust der Adhäsion an benachbarte Zellen im Primärtumor.
2. Die Fähigkeit, die Membranen der umgebenden anderen Gewebe zu durchdringen.

Bildung eines Tumors

Die Entstehung eines echten Tumors erfolgt in mehreren Schritten. Bei den meisten Formen von Krebs sind dazu mehrere somatische Mutationen erforderlich (Abb. 18.21). Bei Darmkrebs sind beispielsweise häufig die folgenden Defekte vorhanden:

1. Inaktivierung (beider Kopien) des *APC*-Antionkogens;
2. Aktivierung des *ras*-Onkogens;



18.21 Schritte bei der Entwicklung eines Tumors und von Metastasen

Wie komplex Krebs ist, zeigt sich daran, wie viele Mutationen erforderlich sind, bevor ein metastasierender Darmkrebs entsteht. Der Prozess beginnt zunächst durch den Verlust des *APC*-Antionkogens auf Chromosom 5, gefolgt von Mutationen des *ras*-Onkogens, einer Inaktivierung von *DCC* und schließlich einem Defekt von *p53*. Die Ziffern in Klammern geben an, auf welchen Chromosomen die Gene liegen. Durch jede Mutation entfernt sich die Zelle weiter vom Normalzustand und verliert nach und nach ihre Funktion.

3. Gefäßbildung im Tumor; dadurch wird dieser nicht nur mit Nährstoffen versorgt, dies verschafft auch den mobilen Krebszellen Zugang zum Blutkreislauf.

Damit sich ein Krebstumor bildet, sind mehrere genetische Mutationen nötig. Die Bildung von Metastasen erfordert noch weitere Mutationen.

Ererbte Anfälligkeit für Krebs

Vermutungen zufolge sind etwa 5–10 % aller Krebsfälle größtenteils auf genetische Störungen zurückzuführen. Über viele der daran beteiligten Gene ist noch zu wenig bekannt, man kann sie jedoch in drei Kategorien einteilen.

Erstens kann es vorkommen, dass man – wie bereits erwähnt – eine defekte Kopie eines Antionkogens erbt. In diesem Fall enthält jede somatische Zelle von Beginn an eine fehlerhafte Kopie, sodass nur noch eine einzige somatische Mutation nötig ist, um die beiden Antionkogene völlig zu inaktivieren. (Man beachte: Werden zwei defekte Kopien eines Antionkogens vererbt, ist dies normalerweise letal. Gentechnisch erzeugte Mausembryonen, die doppelt negativ für solche Gene sind, sterben im Allgemeinen bereits vor der Geburt.)

Zweitens wirken sich Mutationen in ganz bestimmten Genen auf die weitere Mutationsrate während der Zellteilung aus. Solche Gene bezeichnet man als **Mutatorgene**. Dazu gehören an der DNA-Synthese beteiligte Gene wie diejenigen, die für DNA-Polymerase codieren. Es gibt aber auch einige subtilere Mutatorgene, die beispielsweise an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Diese hat man bei Bakterien im Detail erforscht, für den Menschen ist jedoch weniger bekannt. Wie es scheint, sind jedoch einige erbliche Formen von Darmkrebs auf Defekte in Genen zurückzuführen, die an der Fehlpaarungsreparatur beteiligt sind. Dadurch erhöht sich wiederum die Mutationsrate in allen anderen Genen einschließlich der Tumorsuppressorgene. Defekte eines Mutatorgens sind in der Regel rezessiv wie auch die in anderen Tumorsuppressorgenen.

Zu dieser Kategorie gehört der erbliche Brustkrebs. Erbt eine Frau eine einzelne defekte Kopie der Brustkrebsgene – des **BRCA1**- oder **BRCA2**-Gens –, so ergibt sich dadurch eine Prädisposition für Brustkrebs. Etwa 0,5 % der Frauen in den USA tragen Mutationen von **BRCA1**, das zudem eine Prädisposition für Eierstockkrebs bewirkt. Wie bei anderen Tumorsuppressorgenen muss auch hier die zweite Kopie während der Teilung somatischer Zellen mutieren, damit Krebs entsteht. Zwei defekte **BRCA**-Allele wirken sich schon bei Embryonen letal aus. Das **BRCA1**- und das **BRCA2**-Protein sind an der DNA-Reparatur beteiligt. Beide binden an **RAD51**, das bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA eine Rolle

Exkurs 18.1

Revision von Krebs: Fehler bei Studien zur Krebsfrüherkennung

Seit Beginn des Kampfes gegen Krebs gelangen vor allem bei der Krebsdiagnose und dem Verstehen von Krebs große Fortschritte, jedoch weniger auf dem Gebiet der Heilung. Aufgrund des massiven eigennützigen Interesses der Krebsforschungsindustrie werden Krebsstatistiken oft übertrieben optimistisch präsentiert. Zu den häufig verbreiteten Fehlinformationen gehört unter anderem ein Fehler bei Studien zur Krebsfrüherkennung, im Englischen als *lead time bias* bezeichnet.

Als Beispiel soll ein Patient dienen, der nach der Diagnose einer schweren Krebserkrankung noch fünf Jahre lebt. Was wäre, wenn sich die Fähigkeiten zur Krebsdiagnose verbesserten und dieser Krebs nun schon fünf Jahre früher erkannt werden könnte. Sofern sich die Behand-

lungsmöglichkeiten nicht verbessern, wird der Patient zehn Jahre nach der Diagnose sterben. Im zweiten Fall überlebt der Patient nach der Krebsdiagnose noch zehn Jahre, im ersten hingegen nur fünf Jahre. Eigentlich hat sich die Überlebenszeit aber gar nicht verlängert. Der Patient lebt nicht länger, er erhält nur fünf Jahre früher die Diagnose und muss fünf Jahre länger mit der Last leben, Krebs zu haben. Durch diese falsche Messung der Überlebensdauer wird mitunter der Anschein erweckt, als hätte man bei der Heilung von Krebs enorme Fortschritte erzielt. In Wirklichkeit gelangen (Daten aus den Jahren 1950 bis 1982 zufolge) deutliche Verbesserungen der Lebenserwartung nur bei einigen wenigen relativ seltenen Formen von Krebs.

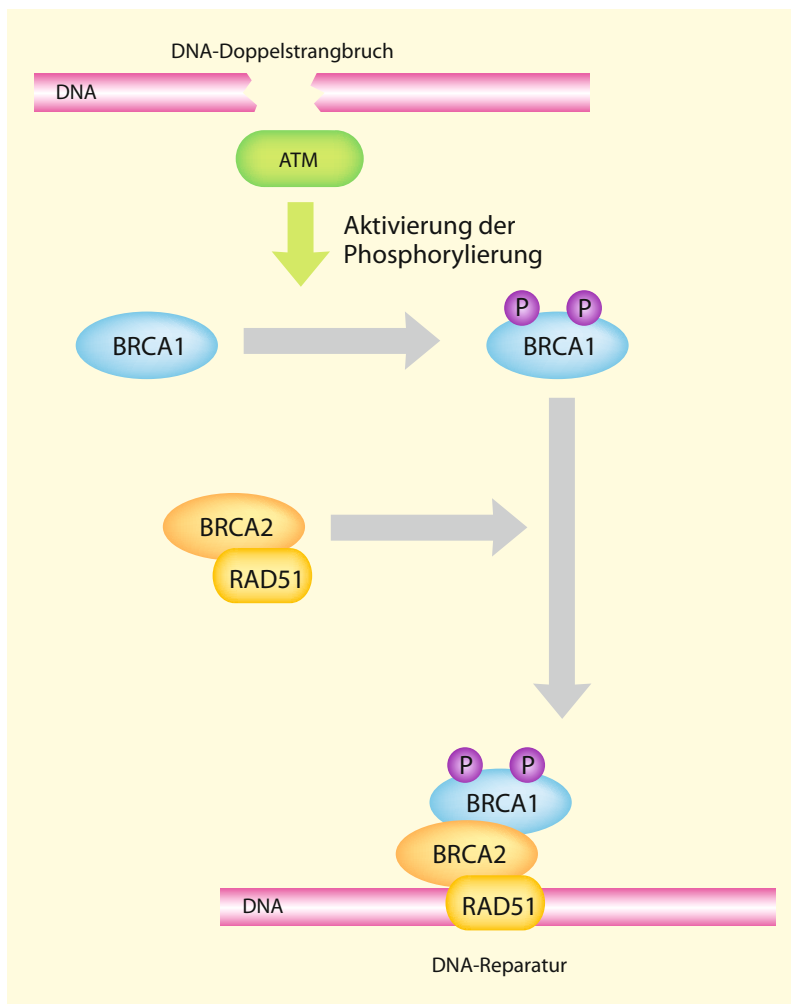
spielt (Abb. 18.22). BRCA1 kommt zusätzlich noch eine weitere Funktion als Transkriptionsregulator anderer Komponenten zu, die zur DNA-Reparatur benötigt werden.

Schließlich ergeben sich noch indirekte Auswirkungen auf die Krebshäufigkeit aufgrund von genetischen Unterschieden zwischen Rassen oder innerhalb von Populationen. Beispielsweise resultieren einige Formen von Hautkrebs aus Mutationen, die durch die ultraviolette Strahlung der Sonne hervorgerufen werden. Hellhäutige Menschen, vor allem solche, die in den Tropen oder in Australien einer höheren Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind, entwickeln häufiger Hautkrebs als Menschen dunklerer Hautfarbe. Der Grund dafür liegt auf der Hand: Je mehr Pigment vorhanden ist, desto weniger UV-Strahlung kann bis zur DNA vordringen.

Genetische Störungen in Antionkogenen, Komponenten der DNA-Replikation und von DNA-Reparatursystemen können ebenfalls eine Prädisposition für Krebs bewirken. Aufgrund einiger genetischer Unterschiede sind manche Menschen anfälliger für bestimmte Formen von Krebs.

Krebserregende Viren

Bei der Entdeckung von Onkogenen spielten Retroviren, die bei Hühnern und Mäusen Krebs auslösen, eine wesentliche Rolle; beim Menschen sind jedoch nur wenige Formen von Krebs auf Retroviren zu-



18.22 BRCA1 und BRCA2 binden an RAD51

Das Vorhandensein eines Doppelstrangbruchs in der DNA löst die Phosphorylierung von BRCA1 über das ATM-Protein aus. BRCA2 und RAD51 binden dann an das Phospho-BRCA1 und sind an dem Prozess der DNA-Reparatur beteiligt.

rückzuführen. Das bekannteste menschliche Retrovirus ist HIV (humanes Immuninsuffizienz-Virus), das Aids verursacht (s. Kap. 22). Zwar sterben manche Aidspatienten an Krebs, das Aidsvirus ist aber nicht die direkte Ursache von Krebs. Es schädigt lediglich das Immunsystem, das ansonsten die meisten Krebszellen abtöten würde, bevor diese zu sehr außer Kontrolle geraten. Das bei Aidspatienten häufig vorkommende Kaposi-Sarkom wird durch eine Sekundärinfektion mit einem weiteren Virus, dem **humanen Herpesvirus 8 (HHV-8)**, hervorgerufen.

Als erstes echtes krebserregendes Virus wurde das **Rous-Sarkom-Virus (RSV)** entdeckt. Vor langer Zeit nahm ein Vorläufer dieses Virus eine Kopie des **src-Onkogens** des Huhns in sein Genom auf. Das Genom eines Retroviruspartikels besteht aus RNA. Wenn das RSV Hühner infiziert, wird die RNA durch Reverse Transkriptase in eine DNA-Kopie umgeschrieben (s. Kap. 22). Anschließend wird die virale DNA zusammen mit dem **src-Onkogen**, das sie trägt, in die Wirtszell-DNA eingebaut. Durch Expression dieser Kopie des **src-Onkogens** entwickeln sich dann Muskeltumoren, die man als **Sarkome** bezeichnet.

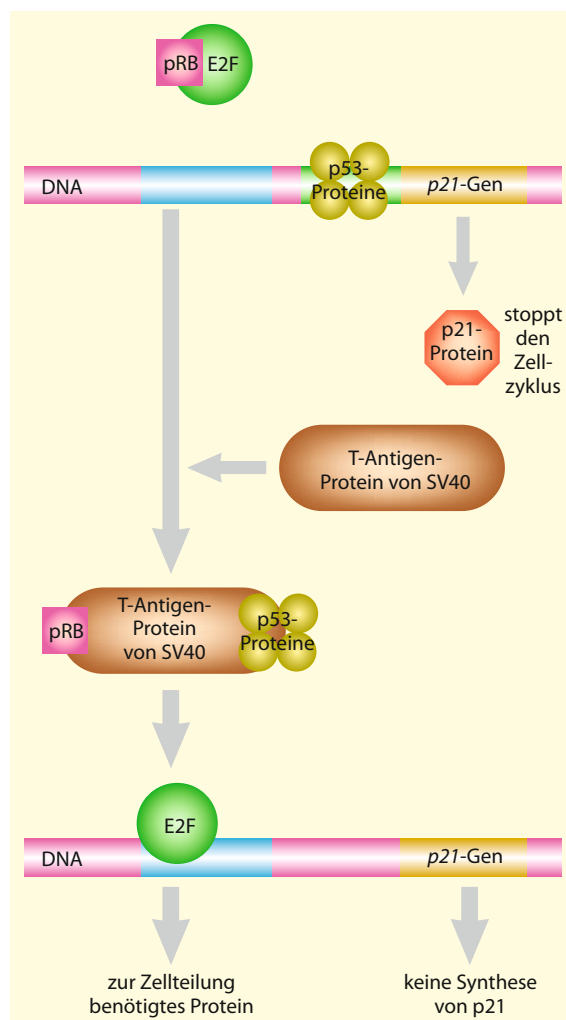
Nur ungefähr 15 % der Krebsarten des Menschen werden von Viren verursacht, die meisten davon von DNA-Viren (**Papillomviren** und **Herpesviren**). Die wichtigsten krebserregenden Viren sind in Tabelle 18.1 zusammengefasst. Am besten untersucht ist das **simiane Virus 40 (SV40)**, das bei Affen Krebs auslöst. Solche DNA-Tumoviren entfalten ihre Wirkung, indem sie die Tumorsuppressorgene der Zelle blockieren. Zunächst baut das DNA-Tumovirus seine DNA in das Chromosom der Zelle ein. Danach synthetisiert es ein Virusprotein, das an die Proteine pRB und p53 der Zelle bindet (Abb. 18.23). Dies

aktiviert die Zellteilung und kann zur Bildung eines Tumors führen.

Auf ähnliche Weise wirken humane Papillomviren, sie produzieren gewöhnlich aber nur gutartige Gewächse, genauer Warzen. Die meisten Papillomviren rufen nur selten gefährliche Tumoren hervor. Es gibt jedoch eine Untergruppe humaner Papillomviren, die durch Geschlechtsverkehr übertragen wird. Diese sind für praktisch alle Formen von Gebärmutterhalskrebs beim Menschen verantwortlich, gelegentlich auch für Krebs anderer Organe.

Tabelle 18.1 Onkogene Viren des Menschen

Virus	Beispiele für Krebs
DNA-Viren	
humanes Papillomvirus	Gebärmutterhalskrebs, Hautkrebs
Epstein-Barr-Virus	Burkitt-Lymphom, Hodgkin-Lymphom
humanes Herpesvirus 8	Kaposi-Sarkom
RNA-Viren	
HTLV-1	adulte T-Zell-Leukämie
Hepatitis-B-Virus	Leberkrebs



18.23 DNA-Tumovirus inaktiviert pRB und p53

Normalerweise bewirken p53 und pRB gemeinsam ein Stoppen des Zellzyklus. Ist die Zelle jedoch mit SV40 infiziert, so produziert dieses Virus ein als T-Antigen bezeichnetes Protein. Dieses bindet an pRB und p53 und setzt dabei E2F zur Aktivierung der Zellteilung frei.

Nur 15 % der Krebsformen des Menschen werden durch Viren verursacht, zum größten Teil durch DNA-Viren.

Gentechnische Erzeugung krebsabtötender Viren

Lytische Viren infizieren und töten ihre Zielzellen (bauen sich also nicht ein oder bleiben latent). Wenn lytische Viren zufällig Krebszellen infizieren, töten sie auch diese ab. Sofern es gelänge, solche Viren spezifisch für Krebszellen zu machen, könnten sie eine wirkungsvolle Therapie gegen Krebs liefern.

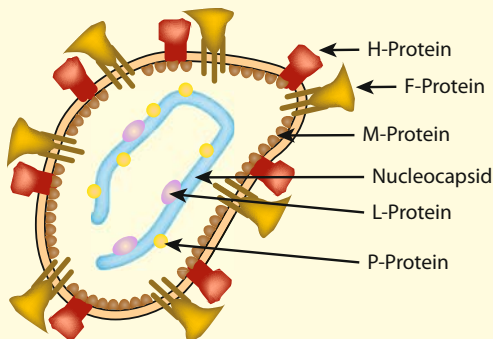
Als Grundlage für die Herstellung **onkolytischer Viren** kommen mehrere Viren in Betracht. Zum

jetzigen Zeitpunkt scheinen Masernviren in vieler Hinsicht geeignet. Die meisten Menschen in den industrialisierten Ländern sind gegen Masern bereits immunisiert, was einen gewissen Schutz gegen unspezifische Gewebeeinfektion und andere Probleme bietet.

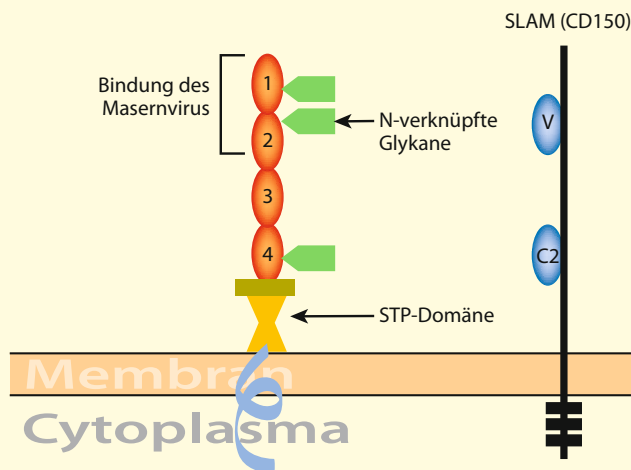
Bestimmte Linien von Masernviren haben von Natur aus eine starke Antitumoraktivität. Sie wirken jedoch nicht krebszellspezifisch und infizieren auch andere Zelltypen. Um sie für Krebszellen spezifisch zu machen, muss man ihre Rezeptorspezifität ändern. Die natürlichen Rezeptoren von Masernviren sind die menschlichen Zelloberflächenproteine CD46 und SLAM (für engl. *signaling lymphocyte activation molecule*; CD150); sie werden vom H-Protein des Masernvirus erkannt (Abb. 18.24).

Im Gegensatz zu vielen anderen Virusfamilien nutzen die Paramyxoviren, zu denen das Masernvirus gehört, zwei separate Virusproteine zum Erkennen

a Masernvirus



b natürliche Rezeptoren



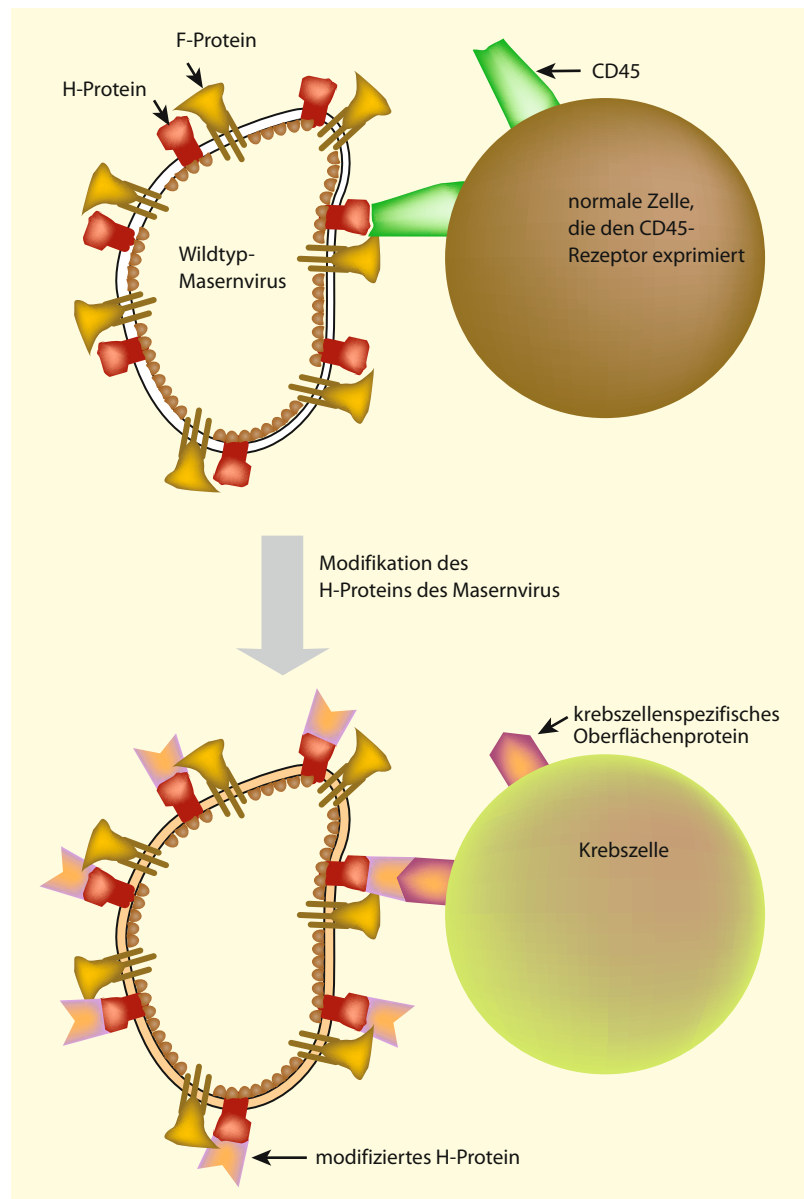
18.24 Natürliche Rezeptoren des Masernvirus

Die beiden Zelloberflächenproteine CD46 und SLAM dienen dem Masernvirus als Rezeptoren. **a** Das Masernvirus besitzt eine Virushülle; sein DNA-Genom befindet sich in einem Nucleocapsid. Die Glykoproteine H und F an der Oberfläche des Virus werden für das Eindringen in die Wirtszelle benötigt. Die internen L- und P-Proteine sind an der Replikation des Virus beteiligt, bei M handelt es sich dagegen um ein Strukturprotein. **b** Domänenstrukturen von CD46 und SLAM (engl. *signaling lymphocyte activation molecule*; CD150).

der Wirtszelle (Protein H) und zum Eindringen in die Wirtszelle (Protein F). Folglich kann man das Erkennungsprotein H radikal modifizieren, ohne dadurch das Eindringen und die Infektion durch den Virus zu beeinträchtigen. Kürzlich hat man Masernviren mit einer Reihe modifizierter H-Proteine hergestellt. Die Mutationen der modifizierten H-Proteine verhindern eine Bindung an CD46 oder SLAM; zudem weisen diese Proteine eine zusätzliche C-terminale Domäne auf, die andere Zelloberflächenproteine der Wirtszelle erkennt. Die neue Erkennungsdomäne wurde

als Einzelketten-Fv-Fragment oder scFv (für engl. *single-chain*) erzeugt (zur Struktur und Erzeugung von scFv-Ketten s. Kap. 6).

Man hat auch Masernviren hergestellt, die als neue Ziele an CD38 oder den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (für engl. *epidermal growth factor receptor*) binden – Proteine, die von Krebszellen häufig in großen Mengen exprimiert werden (Abb. 18.25). Die neuen Viren waren spezifisch für kultivierte Krebszellen mit CD38 oder EGFR an ihrer Zelloberfläche. Es kam aber noch besser: Als man



18.25 Auf Krebszellen umorientiertes Masernvirus

Das externe Glykoprotein H kann so modifiziert werden, dass es ein anderes Wirtszellprotein erkennt. Statt an CD46 oder SLAM bindet es nun an krebszellenspezifische Oberflächenproteine wie CD38 oder EGFR.

in Mäuse menschliche Tumoren implantierte, die an der Oberfläche die Proteine CD38 oder EGFR präsentierten, und diesen Mäusen anschließend die umorientierten Viren injizierte, wurden die Tumoren dadurch recht effizient zerstört. Man hofft, diese Methode irgendwann auch erfolgreich bei menschlichen Krebspatienten einsetzen zu können.

Durch eine Modifikation des viralen Proteins, das an die menschliche Wirtszelle bindet, in eine Form, die nur noch Krebszellen erkennt, kann man aus einem normalen ein onkolytisches Virus machen – d.h. dieses Virus infiziert und tötet nur noch Krebszellen.

► Weiterführende Literatur

- Boulton SJ (2006) Cellular functions of the BRCA tumor-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans* 34: 633–645
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259–269
- Gudmundsdottir K, Ashworth A (2006) The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 25: 5864–5874
- Jass JR (2006) Colorectal cancer: A multipathway disease. *Crit Rev Oncog* 12: 273–287
- Karakosta A, Golias Ch, Charalabopoulos A, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos K (2005) Genetic models of human cancer as a multistep process. Paradigm models of colorectal cancer, breast cancer, and chronic myelogenous and acute lymphoblastic leukaemia. *J Exp Clin Cancer Res* 24: 505–514
- Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M (2007) Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 10: 13–29
- Nagaraju G, Scully R (2007) Minding the gap: The underground functions of BRCA1 and BRCA2 at stalled replication forks. *DNA Repair (Amsterdam)* 6: 1018–1031
- Ren T, Chen Q, Tian Z, Wei H (2007) Down-regulation of surface fractalkine by RNA interference in B16 melanoma reduced tumor growth in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 978–984
- Takahashi C, Ewen ME (2006) Genetic interaction between Rb and N-ras: Differentiation control and metastasis. *Cancer Res* 66: 9345–9348
- Wang W (2007) Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* 8: 735–748
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302: 1–12
- Zhang H (2007) Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol* 210: 567–574

Nichtinfektiöse Krankheiten

Zellkommunikation

Rezeptoren und Signalübertragung

Steroide und andere lipophile Hormone

Zyklisches AMP als sekundärer Bote

Stickstoffmonoxid und zyklisches GMP

Zyklische Phosphodiesterase und Erektionsstörungen

Insulin und Diabetes

Der Insulinrezeptor

Klonieren und gentechnische Herstellung von Insulin

Fettleibigkeit und Leptin

Fettleibigkeit wird durch zahlreiche Gene beeinflusst

Fettabbau

Monoamin-Oxidase und Gewaltverbrechen

Weiterführende Literatur

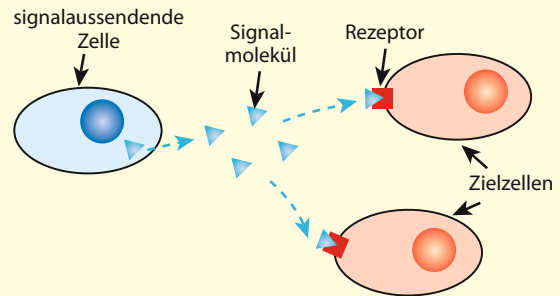
Viele der komplexeren Krankheiten höherer Organismen sind auf Anomalien bei der Signalübertragung und Regulation zurückzuführen. Zu diesen Anomalien kann es aufgrund von erblichen Defekten kommen oder auch aufgrund von Verletzungen und Durchblutungsstörungen im Laufe des Wachstums und der Entwicklung. Komplexe Angelegenheiten wie Übergewicht, Diabetes und Verhaltensstörungen resultieren häufig aus einem Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen. Zunächst sollen hier die Grundlagen der Kommunikation zwischen den Zellen höherer vielzelliger Organismen betrachtet werden.

Zellkommunikation

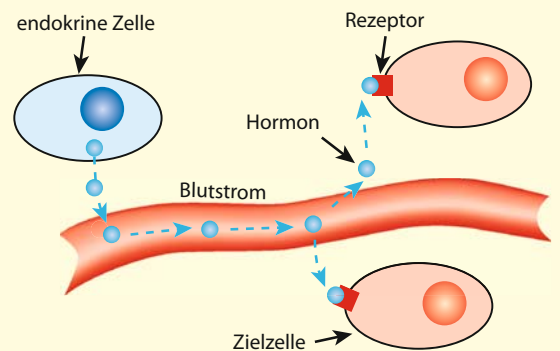
Bei vielzelligen Organismen müssen die Aktivitäten der vielen verschiedenen Zellen koordiniert werden. Das ist nur durch ständige Kommunikation möglich. Bisweilen erfolgt die Signalübertragung über direkte Zell-Zell-Kontakte. Häufiger werden die Signale jedoch auf chemischem Wege versandt, ob zwischen benachbarten Zellen oder über relativ große Entfernungen hinweg. Moleküle, die Signale zwischen benachbarten Zellen übertragen, bezeichnet man als **lokale Mediatoren**; **Hormone** hingegen übertragen Signale an weiter entfernte Gewebe oder Organe (Abb. 19.1). Zusätzlich zu diesen internen Signalen zwischen Zellen können Organismen auch Signale an andere Individuen aussenden. Solche von Organismus zu Organismus ausgesandten Signalmoleküle nennt man **Pheromone**. Selbst einzellige Mikroorganismen wie Hefen und Bakterien kommunizieren untereinander über Pheromone. Hefen signalisieren über sezernierte Pheromone ihre Bereitschaft zur Paarung. Man beachte den Unterschied: Pheromone dienen der Signalübertragung zwischen Organismen, Hormone zirkulieren innerhalb von vielzelligen Organismen.

Hormone und Pheromone übertragen Botschaften von Tieren, Pflanzen und Pilzen über weite Entfernungen. Anders als Pflanzen und Pilze besitzen vielzellige Tiere zudem Nervensysteme, die Botschaften aussenden können. In diesem Fall wird das Signal über elektrische Impulse entlang extrem langgestreckter Zellen, den **Nervenzellen** oder **Neuronen**, übertragen und gelangt zu Kontaktstellen, den **Synapsen** (Abb. 19.2). Hier muss das Signal auf chemische Weise die Lücke (den synaptischen Spalt)

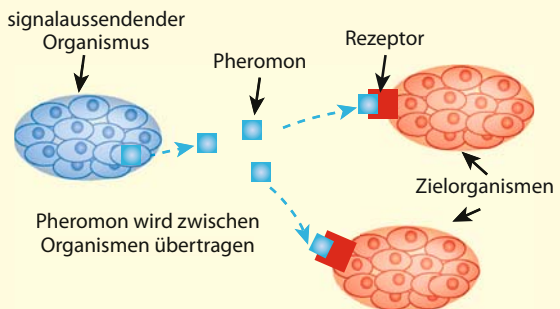
a lokale Mediatoren



b Hormone



c Pheromone

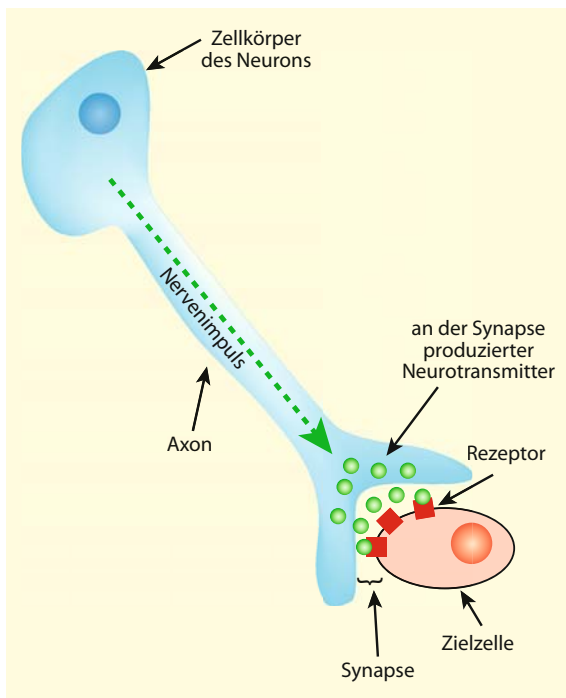


19.1 Lokale Mediatoren, Pheromone und Hormone

Zur Stimulation von Zellen dienen drei verschiedene Formen chemischer Signale. Benachbarte Zellen können über lokale Mediatoren miteinander kommunizieren. Endokrine Zellen schütten Hormone aus. Diese übertragen über den Blutstrom Signale zu anderen Zellen, die sich weit entfernt von der Ausgangszelle befinden können. Schließlich können ein- und vielzellige Organismen noch Pheromone freisetzen, die über die Umgebung zu anderen Organismen gelangen.

zwischen zwei Zellen überwinden. Jeder ankommende elektrische Impuls stimuliert die Freisetzung von **Neurotransmittern** aus den Nervenzellen. Diese chemischen Signalmoleküle diffundieren durch den schmalen Spalt zur nächsten Zelle. Nervenimpulse breiten sich sehr viel schneller aus als Hormone. Zudem überträgt jede Nervenzelle ihr Signal nur an eine einzige Zielzelle. Hormone wirken dagegen auf zahlreiche Rezipientenzellen ein und breiten sich relativ langsam aus.

Die Kommunikation zwischen Zellen spielt bei vielzelligen Organismen eine wichtige Rolle. Lokale Mediatoren übertragen Signale zwischen benachbarten Zellen. Hormone werden über den Blutstrom übertragen und aktivieren andere, weit entfernt gelegene Zellen. Pheromone übertragen Signale über die Luft, das Wasser oder den Boden zu anderen Organismen. Wirbeltiere besitzen Neuronen, die über Neurotransmitter eine Kommunikation zwischen Zellen ermöglichen.



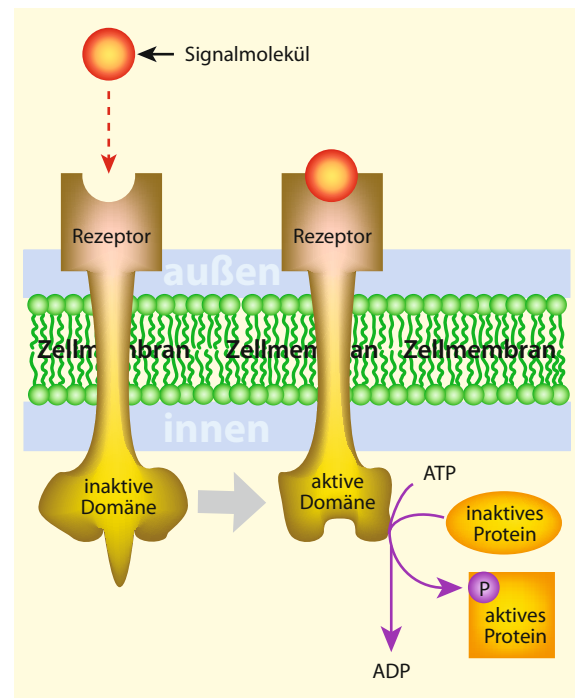
19.2 Neuronen und Neurotransmitter

Neuronen sind auf die Signalübertragung spezialisierte Zellen vielzelliger Tiere. Die Neuronen produzieren einen Neurotransmitter, der den synaptischen Spalt überwindet und eine Zielzelle aktiviert.

Rezeptoren und Signalübertragung

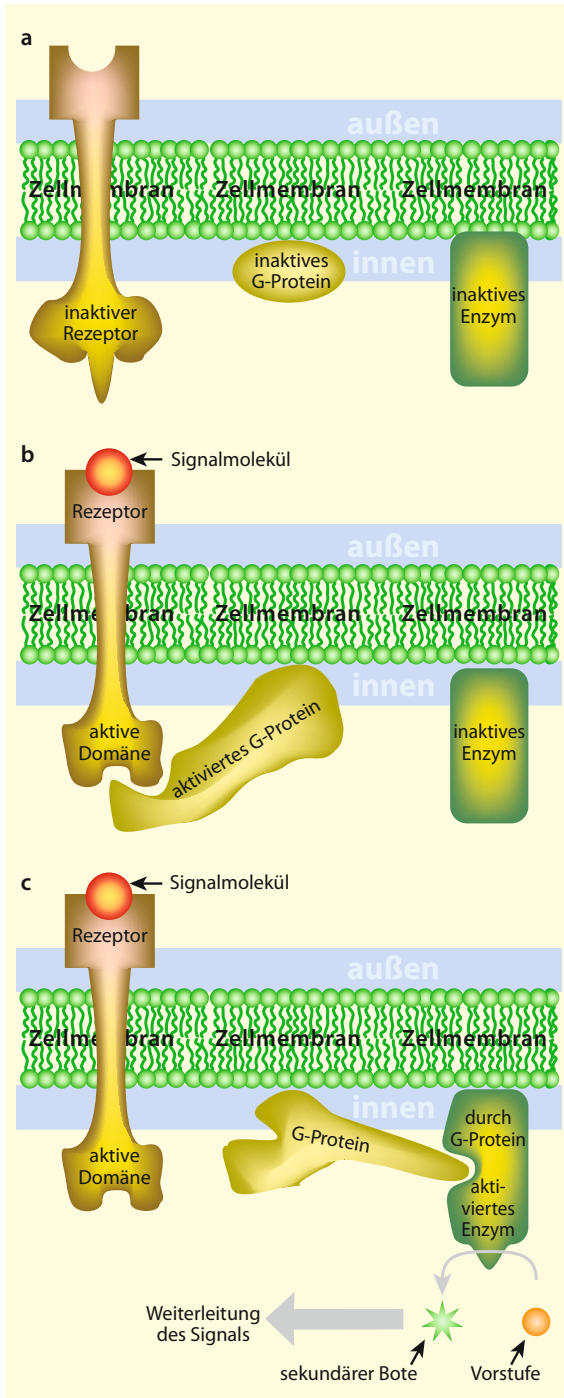
Zur Übertragung von Signalen dienen viele verschiedene Moleküle, in allen Fällen benötigen die Rezipientenzellen jedoch einen **Rezeptor**. Dabei handelt es sich im Allgemeinen um ein Protein in der Cytoplasmamembran, dessen Bindungsstelle für das Botenmolekül nach außen weist. Ein ankommendes Signalmolekül bindet an den Rezeptor und bewirkt eine Konformationsänderung. Der Rezeptor überträgt das Signal dann auf andere Proteine, die man als **Signalübertragungsproteine** bezeichnet. Während der Signalübertragung dimerisieren oder dissoziieren die Rezeptoren und Signalproteine häufig. Man unterscheidet drei Haupttypen der Signalübertragung.

1. **Phosphotransferasesysteme.** Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt eine Phosphorylierung der Signalproteine (Abb. 19.3). **Proteinkinasen** übertragen Phosphatgruppen von ATP auf andere Proteine. Der aktivierte Rezeptor kann selbst



19.3 Phosphotransferasesystem

Ein Signalmolekül induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die dessen Autophosphorylierung bewirkt. Daraufhin überträgt der Rezeptor Phosphatgruppen an weitere Proteine der Kaskade.



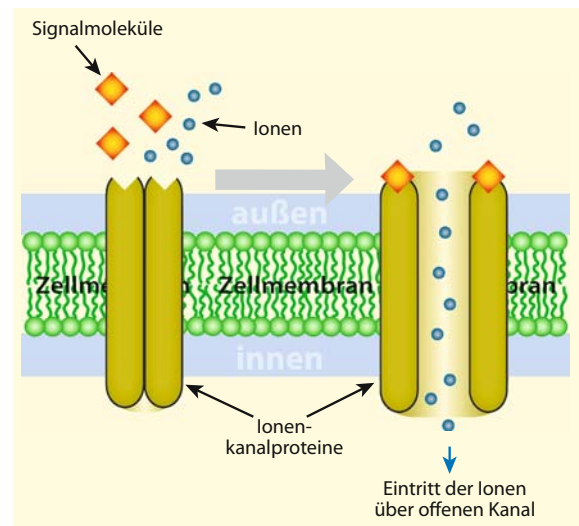
19.4 Sekundäre Boten

Als Reaktion auf die Aktivierung des Rezeptors werden kleine intrazelluläre Signalmoleküle produziert, die man als sekundäre Boten (*second messenger*) bezeichnet. Der aktive Rezeptor aktiviert zunächst ein G-Protein. Dieses aktiviert daraufhin wiederum ein membrangebundenes Enzym, welches dann den sekundären Boten synthetisiert.

als Proteinkinase fungieren oder an eine andere Proteinkinase binden und diese aktivieren. An einer Phosphatübertragungskaskade sind häufig mehrere Proteine beteiligt. Über eine solche Kaskade kann das Signal auf verschiedenste Weise verstärkt oder moduliert werden.

2. **Sekundäre Boten** (engl. *second messenger*). Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Synthese eines kleinen intrazellulären Signalmoleküls, das als sekundärer Bote oder Botenstoff bezeichnet wird (Abb. 19.4). Dieser kann direkt verschiedene Enzyme aktivieren oder inhibieren und auch in den Zellkern gelangen und sich dort auf die Genexpression auswirken. Häufig ist der Rezeptor über ein GTP-bindendes **G-Protein** mit dem Enzym verbunden, das den sekundären Boten synthetisiert.
3. **Ionenkanalaktivierung**. In diesem Fall fungiert der Rezeptor selbst als Ionenkanal (Abb. 19.5). Als Reaktion auf ein ankommendes externes Signal öffnet oder schließt sich dieser. Durch den veränderten Eintritt von Ionen durch den Kanal wird dann die weitere Signalübertragung vermittelt.

Bei der Signalübertragung gelangt das externe Signal in die Zelle und die Information in den Zellkern. Die Signalübertragung kann über Phosphotransferasesysteme, sekundäre Boten und Ionenkanäle erfolgen.



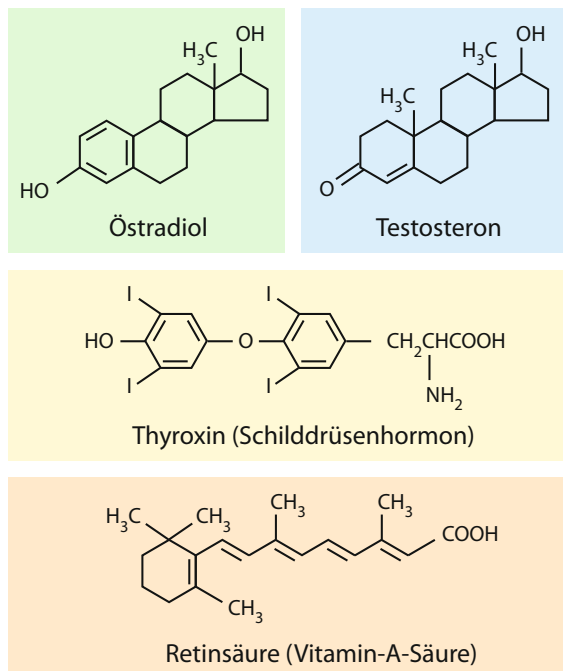
19.5 Ionenkanalaktivierung

Die Bindung eines Signalmoleküls an einen Ionenkanal induziert eine Konformationsänderung, durch die sich der Kanal öffnet. Durch den offenen Kanal können nun ungehindert Ionen in die Zelle eintreten.

Steroide und andere lipophile Hormone

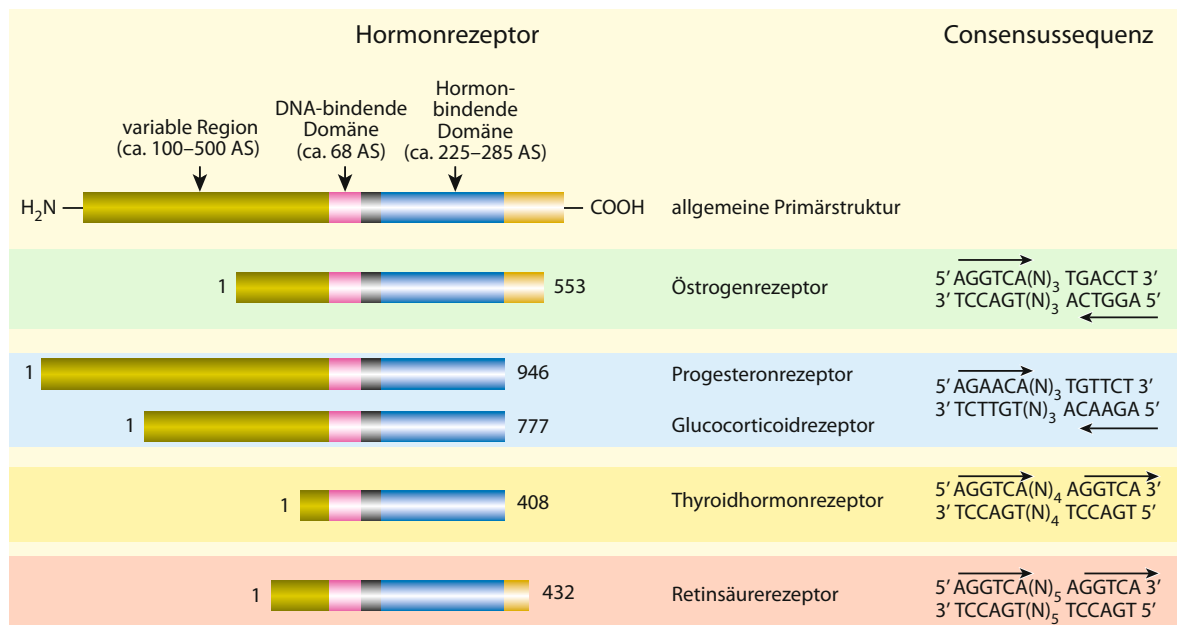
Die meisten Hormone und Pheromone sind auf eine Bindung an Zelloberflächenrezeptoren angewiesen; es gibt jedoch auch Ausnahmen. Bestimmte lipophile Hormone können durch die Zellmembran hindurchdiffundieren. Dazu zählen **Thyroxin (Schilddrüsenhormon)**, Retinsäure und die **Steroidhormone** (Abb. 19.6). Nachdem sie in die Zelle gelangt sind, binden diese an interne Rezeptoren, bei denen es sich um lösliche Proteine handelt. Diese Rezeptoren erfüllen eine Doppelfunktion als Transkriptionsfaktoren und binden direkt an die DNA. Weil lipophile Hormone jedoch schwer in Wasser löslich sind, sind sie für ihren Transport von Zelle zu Zelle über den Blutstrom auf Transportproteine angewiesen. Im Gegensatz dazu diffundieren wasserlösliche Hormone ungehindert durch das Blut, können aber nicht in die Zellmembran überwinden und daher nicht in die Zellen eindringen. Sie binden vielmehr an Rezeptoren an der Zelloberfläche und aktivieren diese.

Die Rezeptoren für die lipophilen Hormone gehören zur Proteinüberfamilie der **Kernrezeptoren** (Abb. 19.7). Neben ihrer Rolle als Hormonrezeptoren



19.6 Struktur lipophiler Hormone

Lipophile Hormone können aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer hydrophoben Eigenschaften durch Zellmembranen hindurchdiffundieren.



19.7 Hormonrezeptorenfamilie

Hormonrezeptoren besitzen eine variable Region, eine DNA-bindende Domäne und eine Hormon-bindende Domäne. Die verschiedenen Rezeptoren erkennen unterschiedliche, sechs Basenpaare lange Sequenzwiederholungen der DNA und aktivieren so die Transkription hormonsensitiver Gene. (AS = Aminosäuren)

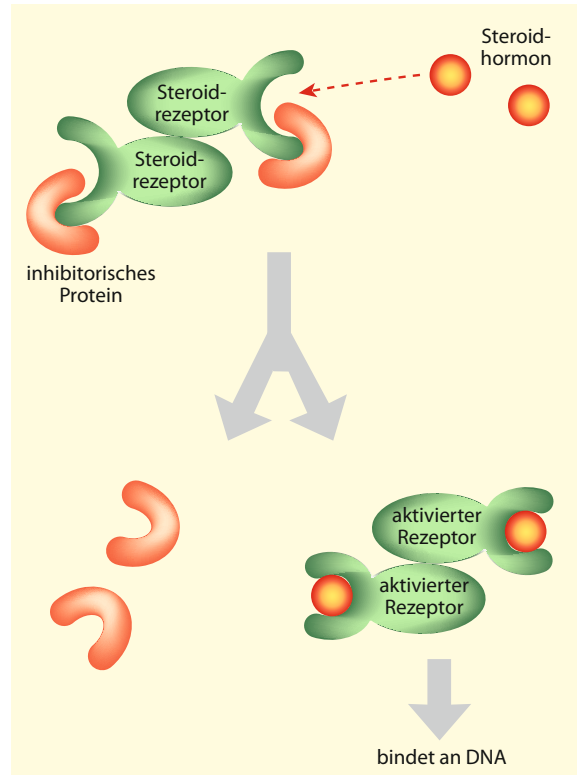
fungieren diese alle als Transkriptionsfaktoren und binden an Erkennungssequenzen in der strangaufwärts gelegenen DNA-Region ihrer Zielgene. Man kann sie in zwei Klassen unterteilen:

1. Die meisten **Steroidrezeptoren** wie der Östrogenrezeptor oder der Glucocorticoidrezeptor finden sich im Cytoplasma. Nach Bindung des Steroidhormons gelangen sie in den Zellkern (Abb. 19.8). Diese Rezeptoren bilden Dimere, die invertierte Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) aus 6 bp in der DNA erkennen.
2. Die Rezeptoren für Androgene, Vitamin D (ein Steroidhormon), Thyroxin und Retinsäure sind permanent im Zellkern lokalisiert. Offenbar gelangen die Hormone über das intrazelluläre Membransystem zur Kernmembran und binden an ihre Rezeptoren im Innern des Zellkerns. Diese Rezeptoren binden an das verwandte **RXR-Protein** (Retinoid-X-Rezeptor, Retinolsäurerezeptor) und bilden gemischte Dimere (s. Abb. 19.7). Diese erkennen direkte Sequenzwiederholungen aus sechs Basenpaaren in der DNA. Dieselbe 6 bp lange Sequenz kann von verschiedenen Rezeptoren erkannt werden; in diesem Fall weichen jedoch die Abstände dieser *repeats* voneinander ab.

Durch Schadstoffe aus der Industrie wurde die Umwelt mit verschiedenen polyzyklischen Molekülen kontaminiert, die mehr oder weniger stark Steroidhormonen ähneln. Diese können (durch Aufnahme mit der Nahrung oder über die Haut) in den Körper gelangen und aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften durch Zellmembranen diffundieren. Einige dieser sogenannten **Xenöstrogene** binden an Steroidrezeptoren und ahmen die Wirkung von Östrogenen nach. Das kann Fortpflanzungsstörungen zur Folge haben oder Gebärmutterkrebs auslösen. Es wurde die Vermutung geäußert, dass der starke Rückgang der Spermienzahl bei Männern in den Industrienationen, vor allem in den USA, im Laufe der letzten fünf Jahrzehnte auf solche Östrogen-nachahmende Substanzen zurückzuführen sein könnte; beweisen konnte man dies allerdings noch nicht.

Lipophile Hormone gelangen durch Diffusion von außerhalb der Zelle durch die Zellmembran ins Cytoplasma.

Dort binden die lipophilen Hormone an Rezeptoren im Cytoplasma oder im Zellkern. Der aktivierte Hormon-Rezeptor-Komplex bindet direkt an die DNA und aktiviert die Transkription von Genen, die am Wachstum beteiligt sind.



19.8 Aktivierung von Steroidrezeptoren

Steroidrezeptoren sind Dimere mit zwei Bindungsstellen für das Hormon. Im inaktiven Zustand blockieren inhibitorische Proteine die Bindungsstellen. Durch Aktivierung werden die inhibitorischen Proteine freigesetzt und ermöglichen eine Bindung des Hormons. Die aktiven Rezeptoren können an ihre Erkennungssequenzen auf der DNA binden und so die entsprechenden Gene aktivieren.

Zyklisches AMP als sekundärer Bote

Vielzellige Tiere verwenden häufig das regulatorische Nucleotid **zyklisches AMP** (zyklisches Adenosinmonophosphat; **cAMP**) als sekundären Botenstoff. Vergleicht man, wie zyklisches AMP von Bakterien, einzelligen Eukaryoten und höheren Organismen verwendet wird, so wird deutlich, wie das Zusammenspiel von Signalübertragung, Vielzelligkeit und Fortpflanzung sich auf der Leiter der Evolution weiterentwickelt hat.

Synthetisiert wird zyklisches AMP aus ATP durch das Enzym **Adenylat-Cyclase**, das bei Bakterien und

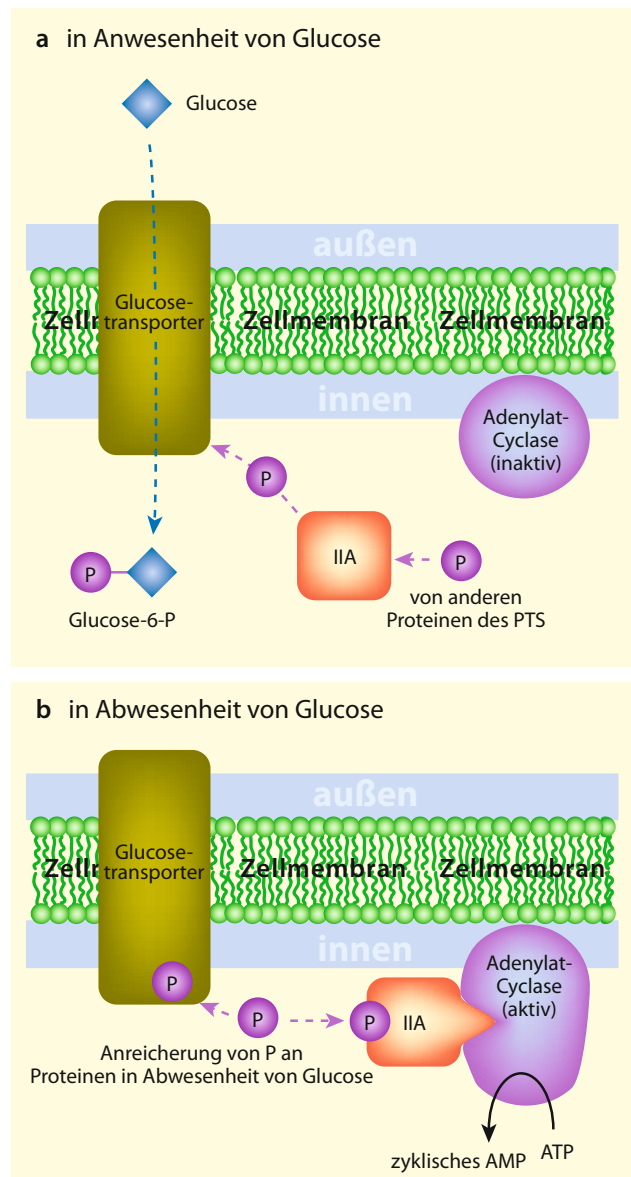
Eukaryoten in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Zyklisches AMP ist in der Natur weit verbreitet, erfüllt jedoch sehr unterschiedliche regulatorische Funktionen. Bei Bakterien reguliert cAMP häufig die Genexpression als Reaktion auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen; die Art des Nährstoffs kann jedoch je nach Bakterientyp variieren. Bei Tieren dient cAMP oft als sekundärer Bote und überträgt Signale von einem Rezeptor zum Zellkern.

Trotz dieser offensichtlichen Unterschiede bestehen auch grundlegende Ähnlichkeiten zwischen den Signalsystemen von Prokaryoten und Eukaryoten. Wie viel cAMP produziert wird, hängt von der Aktivität der Adenylat-Cyclase ab; diese ist wiederum von Signalen abhängig, die von anderen Proteinen stammen. Sowohl bei Bakterien als auch bei Tieren kommt das ursprüngliche Signal von außerhalb der Zelle über ein Membranprotein.

Bei *Escherichia coli* reagiert Adenylat-Cyclase auf das Vorhandensein von Glucose (oder andere bevorzugte Zucker) in der Umgebung. Die Proteine des **Phosphotransferasesystems (PTS)**, das Glucose und andere Zucker transportiert, überträgt das Signal auf Adenylat-Cyclase. Beim Eintritt der Glucose in die Bakterienzelle wird auf diese von einem Glucose-transporter eine Phosphatgruppe übertragen, wodurch Glucose-6-phosphat entsteht. Bei reichlich vorhandener Glucose werden so viele Phosphatgruppen verbraucht, dass die Proteine des PTS größtenteils im nichtphosphorylierten Zustand vorliegen (Abb. 19.9). Ist Glucose knapp, reichern sich die phosphorylierten Formen an. An der Signalübertragung ist insbesondere das phosphorylierte Enzym IIA^{Glc} beteiligt. Dieses bindet an die Adenylat-Cyclase und aktiviert diese, zyklisches AMP herzustellen.

Bei Tieren reagiert Adenylat-Cyclase häufig auf hormonelle Botschaften, die Aufschluss über den Ernährungszustand des gesamten Tieres geben. Vermittelt wird dies zumeist über die Kopplung eines Hormonrezeptors an ein G-Protein in der Zellmembran. G-Proteine erhielten ihren Namen, weil ihr Aktivierungsmechanismus auf der Bindung von GTP beruht. Sie durchlaufen einen Zyklus, bei dem das gebundene GTP in GDP und Phosphat gespalten wird (Abb. 19.10). Auf diese Weise wirkt zyklisches AMP infolge von Signalen, die über Hormone die Zelle erreichen, als sekundärer Bote.

Zyklisches AMP erhöht sowohl bei Tieren als auch bei Bakterien die Transkription bestimmter Gene. Bei Bakterien bindet cAMP an das **CRP-Protein** (cAMP-Rezeptorprotein). Dabei handelt es sich um ein DNA-bindendes Protein, das als globaler



19.9 Kontrolle der Adenylat-Cyclase durch Glucose-transport

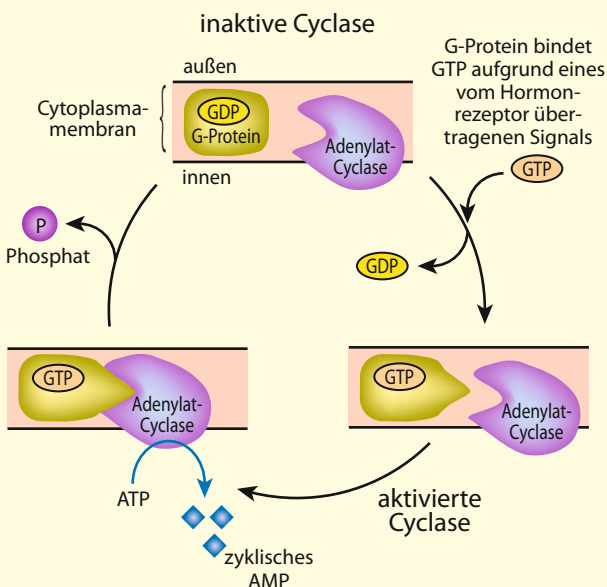
E. coli bevorzugt Glucose als Energiequelle. Der Glucose-transporter startet den Abbau von Glucose durch die Umwandlung in Glucose-6-phosphat. Durch das Enzym IIA^{Glc} wird der Glucose-transporter phosphoryliert; in Anwesenheit von Glucose liegt dieses Enzym größtenteils im nichtphosphorylierten Zustand vor. Nach Aufbrauchen des Glucosevorrats muss die Zelle signalisieren, dass andere Kohlenstoffquellen genutzt werden sollen. Weil das Enzym IIA^{Glc} seine Phosphatgruppe nun nirgendwohin übertragen kann, reichert sich die phosphorylierte Form an und aktiviert die Adenylat-Cyclase. Dieses Enzym wandelt ATP in zyklisches AMP um; dieses signalisiert der Zelle als zweiter Bote, eine andere Kohlenstoffquelle zu nutzen.

Genaktivator fungiert. In tierischen Zellen wirkt sich cAMP nicht nur auf die Genexpression aus, sondern auch direkt auf die Enzymaktivität (Abb. 19.11). So aktiviert die Anreicherung von cAMP bei Tieren die **Proteinkinase A (PKA)** (cAMP-abhängige Proteinkinase). In seiner inaktiven Form besteht dieses Enzym aus zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (K) Untereinheiten. Nach Bindung von cAMP an die R-Untereinheiten werden die C-Untereinheiten freigesetzt und phosphorylieren nun je nach Zelltyp verschiedene Zielproteine. Einige davon sind Enzyme und finden sich im Cytoplasma. Die Phosphorylierung kann je nach betroffenem Enzym zur Aktivierung oder Deaktivierung führen. Zusätzlich gelangen einige wenige aktive K-Untereinheiten in den Zellkern und phosphorylieren dort das **CREB-Protein** (für engl. *cAMP response element binding protein*). Die phosphorylierte Form von CREB bindet an eine spezifische DNA-Sequenz, die **CRE-Sequenz** (für engl. *cAMP response element*), die vor den durch zyklisches AMP aktivierten Genen liegt.

Adenylat-Cyclase synthetisiert als Reaktion auf externe Signale zyklisches AMP. Das cAMP überträgt das externe Signal als sekundärer Bote in den Zellkern.

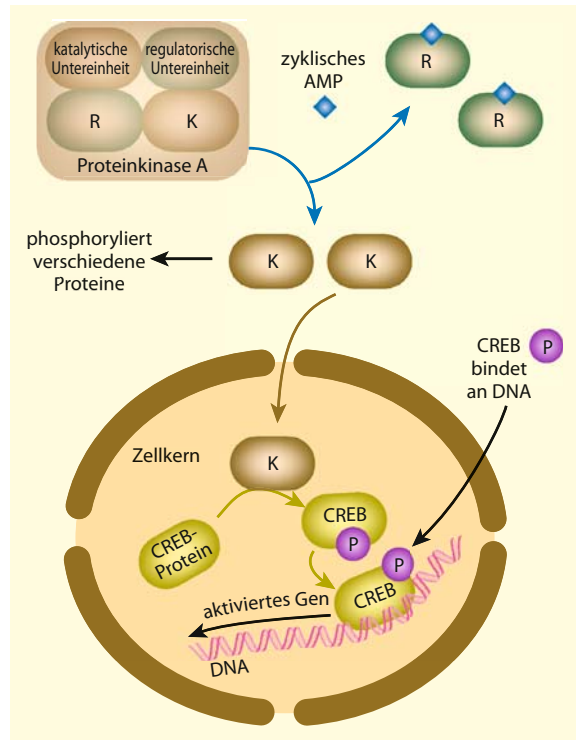
Bakterien nutzen bevorzugt Glucose als Energiequelle, und zwar über das Phosphotransferasesystem. Bei einem Mangel an Glucose aktiviert das phosphorylierte Enzym IIA^{Glc} Adenylat-Cyclase zur Herstellung von cAMP. Dieses schaltet dann Gene an, die andere Zucker abbauen.

In tierischen Zellen dient cAMP als sekundärer Bote zur Aktivierung von Genen im Zellkern. Daneben dient es auch zur Aktivierung von Proteinen im Cytoplasma durch Phosphorylierung.



19.10 Kontrolle der Adenylat-Cyclase durch G-Proteine

Bei Säugetieren aktiviert ein Hormonrezeptor das G-Protein, GTP zu binden. Die GTP-gebundene Form kann nun an Adenylat-Cyclase binden und diese aktivieren, ATP in zyklisches AMP umzuwandeln. Anschließend spaltet das G-Protein sein GTP und setzt Adenylat-Cyclase frei, sodass das Signal nun nicht mehr produziert wird.



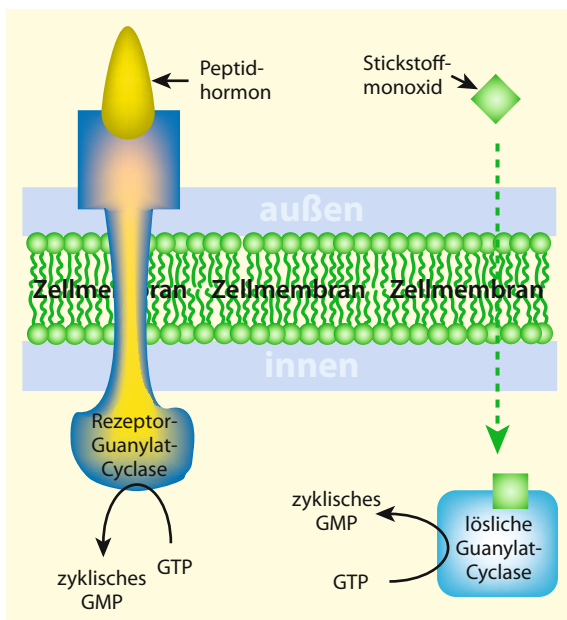
19.11 Die cAMP-Kaskade in tierischen Zellen

In tierischen Zellen reagiert PKA auf die Anwesenheit von zyklischem AMP. Ist kein cAMP vorhanden, liegt PKA als inaktives Tetramer mit zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (K) Untereinheiten vor. Nach Bindung von cAMP an die beiden regulatorischen Untereinheiten dissoziiert das Tetramer; nun können die katalytischen Untereinheiten andere Proteine im Cytoplasma und im Zellkern phosphorylieren. Eines der von PKA aktivierten Proteine ist CREB, ein Transkriptionsfaktor, der Gene mit einer CRE-Bindungsstelle aktiviert.

Stickstoffmonoxid und zyklisches GMP

Eukaryotische Zellen nutzen auch noch einige andere sekundäre Boten. Dazu gehören beispielsweise **zyklisches GMP** (zyklisches Guanosinmonophosphat; **cGMP**), Ca^{2+} -Ionen, Inositoltriphosphat und andere Produkte, die sich von dem Membranlipid Phosphatidylinositol herleiten. Zyklisches GMP entsteht durch das Enzym **Guanylat-Cyclase** aus GTP. Es gibt zwei verschiedene Formen von Guanylat-Cyclasen. Eine davon ist membrangebunden und fungiert auch als Rezeptor für Peptidhormone. Bei der anderen handelt es sich um ein lösliches Protein im Cytoplasma, das durch **Stickstoffmonoxid (NO)** aktiviert wird (Abb. 19.12). Zyklisches GMP kontrolliert das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen und aktiviert über Proteinkinasen die Genexpression. Die cGMP-abhängige Proteinkinase kann in den Zellkern eindringen und reguliert dort die Gentranskription durch Phosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren wie Oct-1.

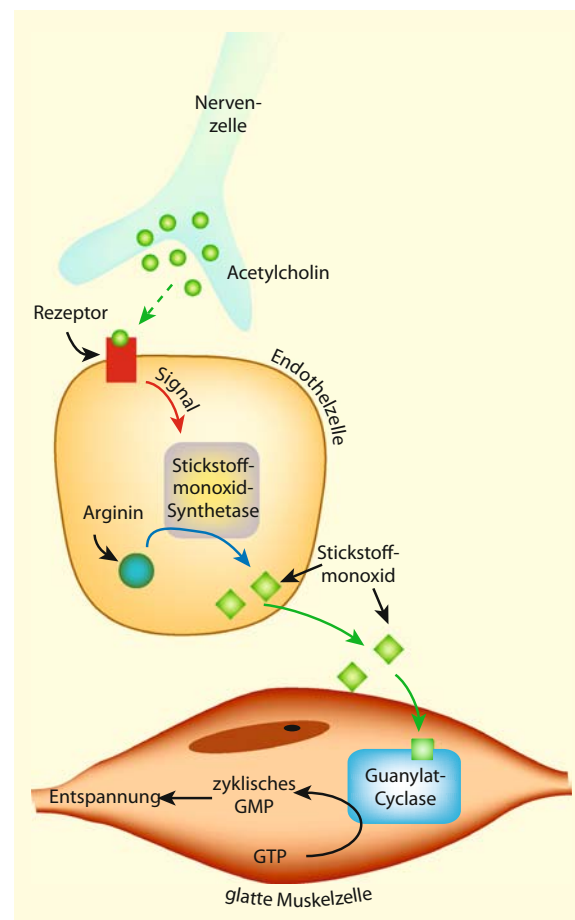
Das Ungewöhnliche an Stickstoffmonoxid ist, dass es sich dabei um ein gasförmiges Signalmolekül handelt. Ob man es eher als Hormon oder als Neurotrans-



19.12 Zwei Formen von Guanylat-Cyclase

Sowohl die Rezeptorform als auch die intrazelluläre Form der Guanylat-Cyclase wandeln GTP in zyklisches GMP um. Die Rezeptorform wird durch Peptidhormone aktiviert, die intrazelluläre Form durch Stickstoffmonoxid.

mitter betrachten sollte, ist umstritten, denn es zeigt in seiner Wirkung Eigenschaften beider Signalformen. Stickstoffmonoxid wirkt über zyklisches GMP. NO ist sehr kurzlebig und an der Kontrolle verschiedener lokaler Zellaktivitäten beteiligt, beispielsweise an der Kontraktion der Wände von Blutgefäßen. Als Reaktion auf Signale von Nervenzellen wird NO aus Arginin und Sauerstoff durch **NO-Synthetase** in Endothelzellen hergestellt. Es diffundiert von dort in die umliegenden Muskelzellen. Hier bindet es an einen Hämcofaktor, der an Guanylat-Cyclase gekoppelt ist, und löst die Produktion von cGMP aus (Abb. 19.13). Dies führt zur Entspannung (Relaxation) des Muskels und zur



19.13 Kontrolle von Guanylat-Cyclase durch Stickstoffmonoxid

Endothelzellen produzieren als Reaktion auf Signale von benachbarten Nervenzellen NO. NO diffundiert durch die Membran der Endothelzellen in Muskelzellen der Umgebung. Dort aktiviert NO Guanylat-Cyclase zur Herstellung von zyklischem GMP, das wiederum eine Entspannung der Muskelzellen bewirkt.

Erweiterung der Blutgefäße. (In höherer Konzentration ist NO toxisch und wird von aktivierten Immunzellen als antibakterieller Wirkstoff produziert.)

Ein weiterer sekundärer Bote, cGMP, wird durch Guanylat-Cyclase synthetisiert. Hormone aktivieren die membrangebundene Form der Guanylat-Cyclase, das gasförmige Signalmolekül Stickstoffmonoxid aktiviert die Guanylat-Cyclase im Cytoplasma.

Zyklische Phosphodiesterase und Erektionsstörungen

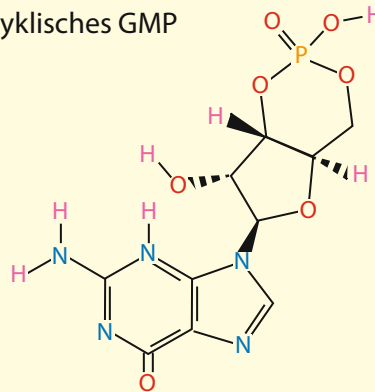
Die zyklischen Nucleotide werden durch das Enzym **zyklische Phosphodiesterase** inaktiviert; diese wandelt sie in die entsprechenden 5'-Nucleosidmonophosphate (5'-AMP beziehungsweise 5'-GMP) um. Der Mensch besitzt mindestens zehn Isoenzyme der Phosphodiesterase, verteilt in verschiedenen Geweben. Einige davon sind spezifisch für cAMP, andere für cGMP (PDE-5, PDE-6 und PDE-9) und wieder andere wirken auf beide ein.

Durch eine Hemmung von **Phosphodiesterase 5 (PDE-5)**, die spezifisch auf cGMP wirkt, bleibt der Gehalt an GMP hoch, und die Blutgefäße bleiben länger geweitet. Dies macht man sich zur Behandlung von Erektionsstörungen (erektile Dysfunktion) bei Männern mit dem Medikament **Viagra (Sildenafil)**; Abb. 19.14) zunutze, einem Inhibitor von PDE-5. In den USA leiden schätzungsweise 20 bis 30 Millionen Männer (in Deutschland sind es rund vier bis sechs Millionen) unter Erektionsstörungen; rund die Hälfte davon konnte durch die Einnahme von Viagra eine Besserung erzielen.

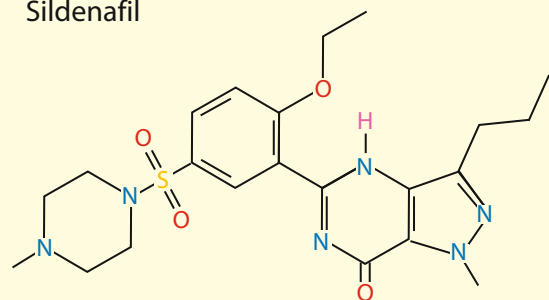
In jüngster Zeit sind die beiden neuen PDE-5-Hemmer Vardenafil (Levitra) und Tadalafil (Cialis) auf den Markt gekommen. Sie wirken in ähnlicher Weise wie Sildenafil, nur etwas stärker. Zudem hat Tadalafil eine längere Halbwertszeit. Während die Wirkdauer von Sildenafil und Vardenafil rund vier Stunden beträgt, liegt sie bei Tadalafil bei etwa 36 Stunden.

Sildenafil hemmt PDE-5, eine Phosphodiesterase, die den zweiten Boten cGMP blockiert. Ohne ein Signal von cGMP bleiben die Blutgefäße erweitert. Daher kann man Sildenafil zur Behandlung von Erektionsstörungen einsetzen.

zyklisches GMP



Sildenafil

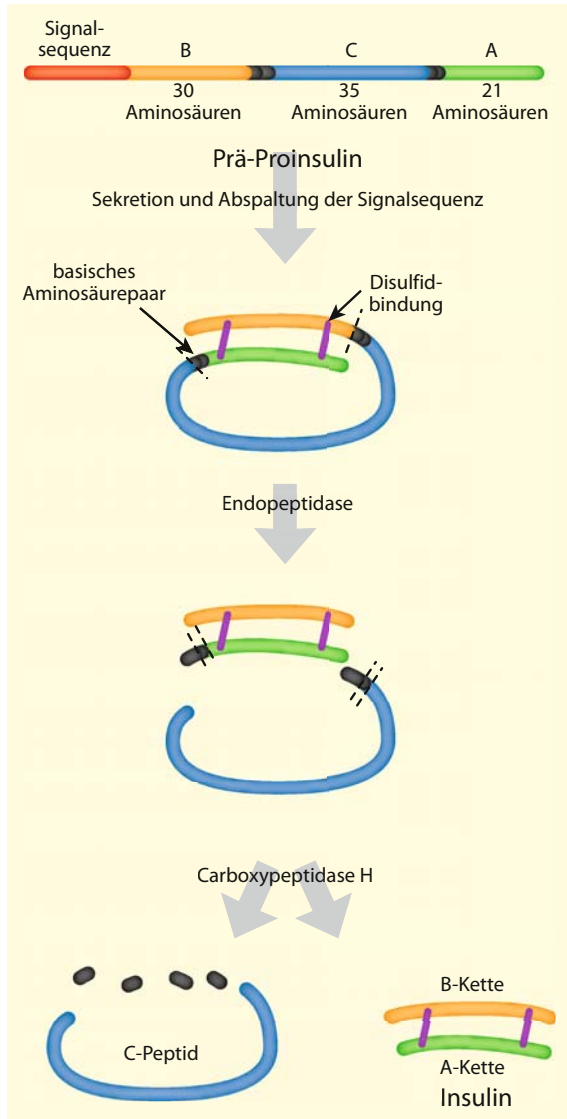


19.14 Zyklisches GMP und sein Analogon Sildenafil

PDE-5 findet sich in den Blutplättchen sowie in der glatten Muskulatur der Eingeweide und der Blutgefäße. Sildenafil hemmt PDE-5 auch in diesen Geweben und verursacht dadurch die Nebenwirkungen der Viagra-Behandlung. Zudem wirkt Sildenafil nicht völlig spezifisch auf PDE-5. Es inhibiert auch leicht PDE-6 in der Netzhaut des Auges. Das könnte die Ursache für Störungen des Farbensehens (für Blau und Grün) sein, die als Nebenwirkungen beobachtet wurden.

Insulin und Diabetes

Diabetes mellitus bezeichnet eine Gruppe miteinander verwandter Krankheiten, die mit einem anomal hohen Glucosespiegel im Blut oder Urin einhergehen. An Diabetes sind mehrere Gene beteiligt, die Symptome variieren im Einzelnen beträchtlich. Vielfach entsteht Diabetes durch einen Mangel an **Insulin**. Dieses kleine Protein-hormon wird von der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) produziert und kontrolliert den Blutzuckerspiegel. Bei Insulinmangel steigt der Blutzuckerspiegel, was mehrere Komplikationen nach sich zieht. Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus (IDDM) können ihren



19.15 Prozessierung von Insulin

Das Gen für Insulin produziert ein Transkript, das in ein einzelnes Protein namens Prä-Proinsulin translatiert wird. Nach der Sekretion wird die Signalsequenz von Prä-Proinsulin abgespalten. Anschließend spaltet eine Endopeptidase das C-Peptid ab. Zurück bleiben die über Disulfidbindungen verbundene A- und B-Kette. Zum Schluss erfolgt noch die Abspaltung der terminalen Arg- und Lys-Reste durch Carboxypeptidase H, sodass aktives Insulin entsteht.

Blutzuckerspiegel durch Injektion von Insulin wieder beinahe auf Normalmaß senken. An anderen Defekten ist der **Insulinrezeptor** beteiligt; hier ist bei einer Insulinbehandlung keine Reaktion erkennbar.

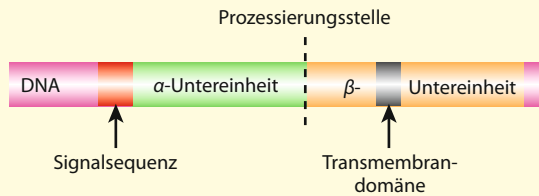
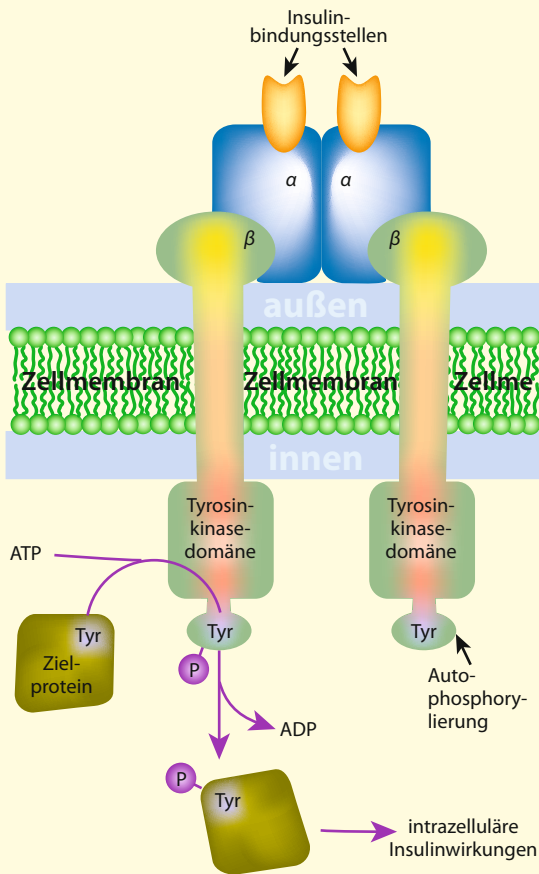
Das Protein Insulin besteht aus zwei separaten Polypeptidketten, der A- und der B-Kette (Abb. 19.15), die durch Disulfidbindungen zusammengehalten werden. Obwohl das fertige Protein aus zwei Polypeptidketten aufgebaut ist, wird Insulin nur durch ein einziges Gen codiert. Bei dem ursprünglichen Genprodukt **Prä-Proinsulin** handelt es sich um eine einzelne Polypeptidkette, die sowohl die A- und B-Kette als auch das verbindende C-Peptid (engl. *connection peptide*) und eine Signalsequenz enthält. Prä-Proinsulin selbst ist kein Hormon und muss zunächst prozessiert werden, damit Insulin entsteht. Die Signalsequenz am N-terminalen Ende wird für die Sekretion benötigt und anschließend von einer Signalpeptidase abgespalten. Dadurch entsteht **Proinsulin**. Um davon das **C-Peptid** abzuspalten, sind **Endopeptidasen** erforderlich, die innerhalb der Polypeptidkette schneiden. Diese erkennen Paare basischer Aminosäuren am Übergang vom C-Peptid zur A- und B-Kette. Schließlich werden durch **Carboxypeptidase H** noch die terminalen Arg- und Lys-Reste abgespalten.

Das Hormon Insulin wird in Form von Prä-Proinsulin produziert. Zunächst wird davon durch eine Signalpeptidase die Signalsequenz abgespalten, anschließend das C-Peptid durch eine Endopeptidase. Zum Schluss erfolgt die Abspaltung der endständigen Arg- und Lys-Reste durch Carboxypeptidase H. Nach dieser Prozessierung besteht Insulin aus zwei über Disulfidbindungen verbundenen Ketten, der A- und B-Kette.

Manche Diabetiker produzieren überhaupt kein Insulin und müssen sich Insulin spritzen. Anderen fehlt der Insulinrezeptor, sodass das Insulin nicht auf seine Zielzellen einwirken kann.

Der Insulinrezeptor

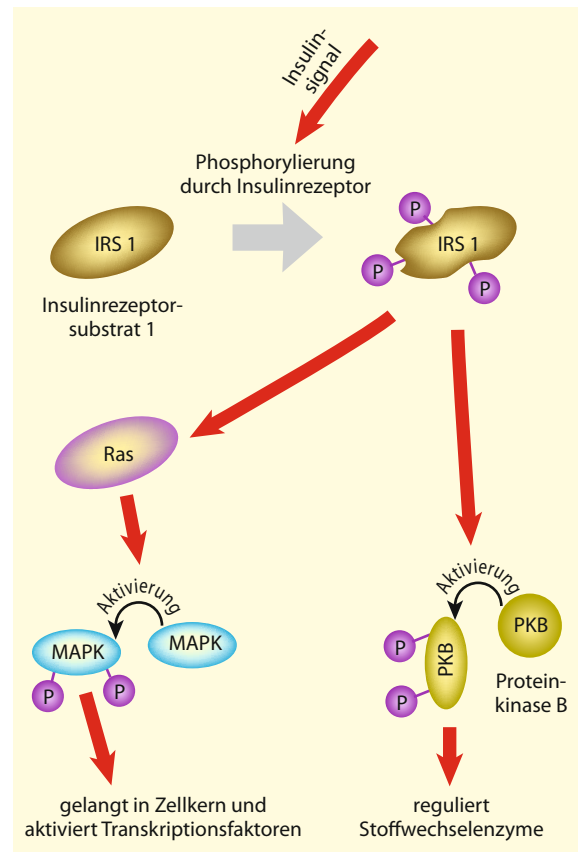
Der Insulinrezeptor ist ein Tetramer aus zwei α - und zwei β -Ketten (Abb. 19.16). Genau wie bei Insulin codiert ein einzelnes Gen für ein einzelnes Proteinprodukt, das dann weiter prozessiert wird: Die Signalsequenz wird abgespalten, und schließlich entstehen die beiden getrennten Ketten des Rezeptors. Die α -Ketten sind an der Zelloberfläche exponiert und binden das Hormon. Zwischen Cystein-reichen Regionen der beiden α -Ketten bilden sich Disulfidbindungen und halten die Ketten beieinander. Die paarigen β -Ketten sind in die Membran eingebettet und weisen eine interne

a Insulinrezeptorgen**b Insulinrezeptorprotein****19.16 Der Insulinrezeptor**

a Das Gen für den Insulinrezeptor weist drei Domänen auf. Diese codieren für die zur Sekretion dienende Signalsequenz, die α -Untereinheit und die β -Untereinheit. **b** Das Insulinrezeptorprotein besteht aus vier Untereinheiten. Die beiden α -Untereinheiten binden an Insulin. Die β -Untereinheiten sind Tyrosinkinase, die an einem Tyrosinrest eine Autophosphorylierung bewirken und das Phosphat auf Tyrosinreste am Zielprotein übertragen. Zusammengehalten wird der Rezeptor durch Disulfidbindungen zwischen den beiden α -Untereinheiten sowie den α - und den β -Untereinheiten.

Signalübertragungsdomäne mit Proteinkinaseaktivität auf. Der Insulinrezeptor kann von verschiedenen Gendefekten betroffen sein. Bekannt sind unter anderem eine verringerte Expression des Rezeptorgens, eine fehlerhafte Prozessierung sowie Defekte bei der Insulinbindung und der Proteinkinaseaktivität. Auf die verschiedenen daraus resultierenden Syndrome zeigt eine Insulinbehandlung keine Wirkung.

Bei normalen Insulinrezeptoren löst die Bindung von Insulin eine Konformationsänderung aus, welche die Proteinkinasedomäne aktiviert. Dadurch werden zwei alternative Phosphorylierungskaskaden initiiert. Der Proteinkinase-B-Weg ist für die kurzzeitige Kontrolle des Glucosemetabolismus verantwortlich; hierbei erfolgt keine Neusynthese von Proteinen

**19.17 Von Insulin ausgelöste regulatorische Kaskaden**

IRS-1 ist ein nachgeschaltetes Ziel für den aktivierten Insulinrezeptor. Nach der Phosphorylierung aktiviert IRS-1 den Ras- und MAPK-Weg; dadurch erhöht sich die Transkription der an der Umwandlung von Glucose in Glykogen beteiligten Gene. Durch Phosphorylierung von Proteinkinase B reguliert IRS-1 auch Stoffwechselenzyme.

(Abb. 19.17). Der andere Weg verläuft über die Signalübertragungsproteine Ras und MAPK (s. Kap. 18) und führt zur Aktivierung von Genen und zur Synthese neuer Proteine über einen längeren Zeitraum. Die Wirkung von Insulin variiert im Detail bei verschiedenen Typen von Zielzellen (z.B. Leber-, Fett- oder Muskelzellen). Insgesamt gesehen senkt Insulin den Blutglucosespiegel und fördert die Speicherung von Glucose in Form von Glykogen. Bei zu niedrigem Blutzuckerspiegel wirkt das Hormon Glucagon als Antagonist zu Insulin und begünstigt den Abbau von Glykogen sowie die Freisetzung von mehr Glucose in den Blutstrom. Glucagon nutzt cAMP als sekundären Boten.

Der Insulinrezeptor besteht aus zwei α -Ketten, an die Insulin bindet, und zwei β -Ketten, an denen die intrazelluläre Kinasedomäne die intrazellulären Proteine aktiviert.

Klonieren und gentechnische Herstellung von Insulin

Insulin gelangte als erstes gentechnisch hergestelltes Hormon in den Handel. Bevor kloniertes menschliches Insulin verfügbar war, mussten sich Diabetespatienten Insulin aus der Bauchspeicheldrüse von Tieren wie Kühen oder Schweinen spritzen. Das

funktionierte insgesamt recht gut. Gelegentlich traten jedoch allergische Reaktionen auf, in der Regel zurückzuführen auf geringe Verunreinigungen in den Extrakten. Heute ist echtes menschliches Insulin (Humulin, vermarktet von Eli Lilly Inc.) erhältlich, hergestellt von rekombinanten Bakterien.

Wird das Insulingen kloniert und dann direkt in Bakterien exprimiert, entsteht zunächst Prä-Proinsulin. Da Bakterien nicht über die Prozessierungsenzyme von Säugetieren verfügen, wandeln sie das Prä-Proinsulin nicht in Insulin um (s. Abb. 19.15). Dieses Problem lässt sich auf zweierlei Weise lösen. Erstens kann man das Prä-Proinsulin reinigen und dann mit Enzymen behandeln, die es in Insulin umwandeln. Das bedeutet, dass diese Prozessierungsenzyme ebenfalls hergestellt werden müssen. Das ist natürlich viel zu kompliziert. Daher hat man sich dafür entschieden, zwei künstliche **Minigene** herzustellen, eines für die A-Kette des Insulins und ein zweites für die B-Kette (Abb. 19.18). Dazu synthetisierte man zwei DNA-Abschnitte, die für die beiden Insulinketten codieren. Diese beiden DNA-Moleküle wurden dann in Plasmide eingebaut und diese in zwei verschiedene bakterielle Wirte eingeschleust. Dadurch war gewährleistet, dass die beiden Insulinketten separat von zwei Bakterienkulturen produziert wurden. Anschließend wurden sie vermischt und einer chemischen Behandlung unterzogen, damit sich Disulfidbindungen ausbilden und sich die Ketten miteinander verbinden konnten.

Durch die gerade beschriebene Methode erhält man Insulin, das seine Funktion recht gut erfüllt.

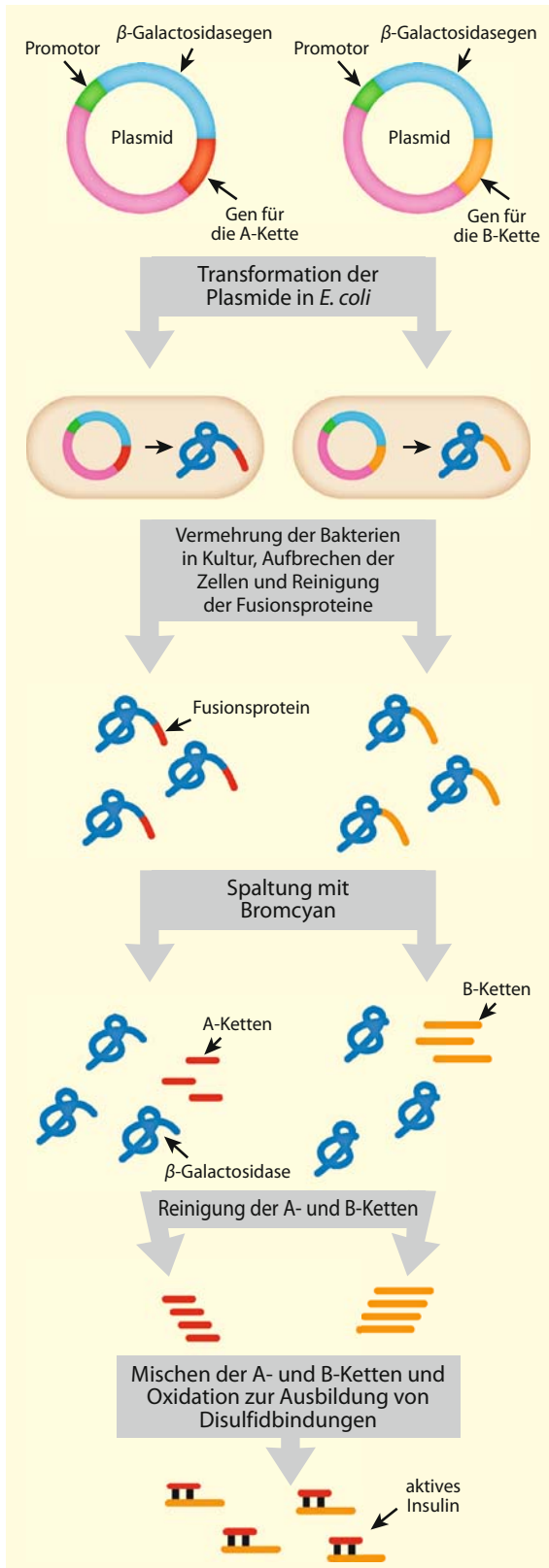
Exkurs 19.1

Stammzelltherapie bei Diabetes

Gegenwärtig besteht großes Interesse an der Regeneration von geschädigten oder kranken Geweben mithilfe von embryonalen Stammzellen. Neben den religiösen und politischen Kontroversen verursacht die Stammzelltherapie auch noch komplexe technische Probleme – nicht zuletzt, was die geeignete Quelle für Stammzellen betrifft. Davon ausgehend, dass all diese Probleme irgendwann gelöst werden, bildet Typ-1-Diabetes eine naheliegende Anwendungsmöglichkeit für eine Stammzelltherapie.

Auf zellulärer Ebene beruht diese Erkrankung auf einer Zerstörung der Insulin-ausschüttenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse. Durch Implantation neuer β -Zellen sollte sich Typ-1-Diabetes heilen lassen, da dies eine

interne Quelle für Insulin liefert. Zahlreiche Forschungen beschäftigen sich damit, die Differenzierung von Stammzellen in Insulin-sekernierende Zellen zu steuern. Im Jahr 2005 konnten Mauszellen erzeugt werden, die als Reaktion auf Glucose Insulin ausschütten. Bei Implantation in Mäuse bewirkten diese zunächst eine Heilung des Diabetes. Nach einigen Wochen bildeten die Zellen allerdings ein Teratom – eine zufällig differenzierte Gewebemasse –, sodass die Heilung des Diabetes nicht erfolgreich war. Wenn es gelänge, solche Probleme zu lösen und die Technik auf menschliche Zellen anzuwenden, könnte es möglich sein, Diabetes eines Tages wirklich zu heilen und nicht nur durch ständige Insulininjektionen die Symptome zu unterdrücken.

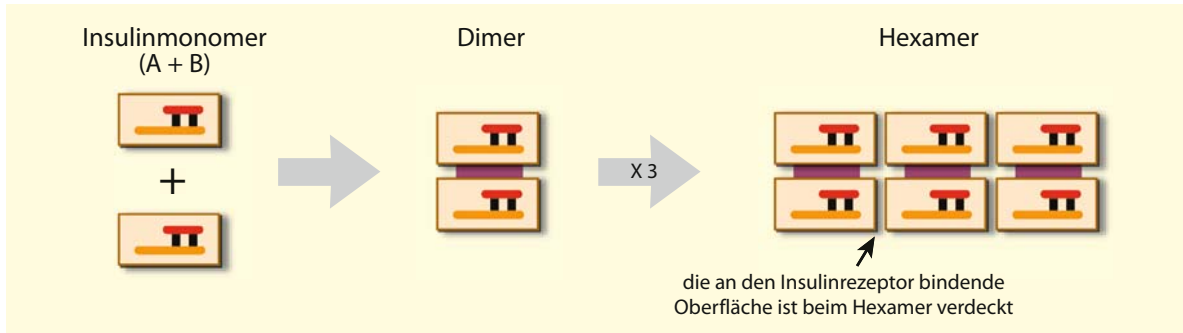


19.18 Klonieren von Insulin in Form von zwei Minigenen

Die Gene für die A- und B-Kette von Insulin wurden in zwei separaten Plasmiden kloniert. Beide Minigene wurden dann mit dem Gen für β -Galactosidase fusioniert, weil das resultierende Protein leicht zu reinigen ist. Anschließend transformierte man die Plasmide in Bakterien zur Expression in getrennten Kulturen. Danach wurden die Bakterien der Kulturen geerntet und die Fusionsproteine gereinigt. Die A- und B-Ketten konnten nun mittels Bromcyan von der β -Galactosidase abgespalten und unter oxidierenden Bedingungen gemischt werden, sodass sich Disulfidbindungen ausbildeten und menschliches Insulin entstand.

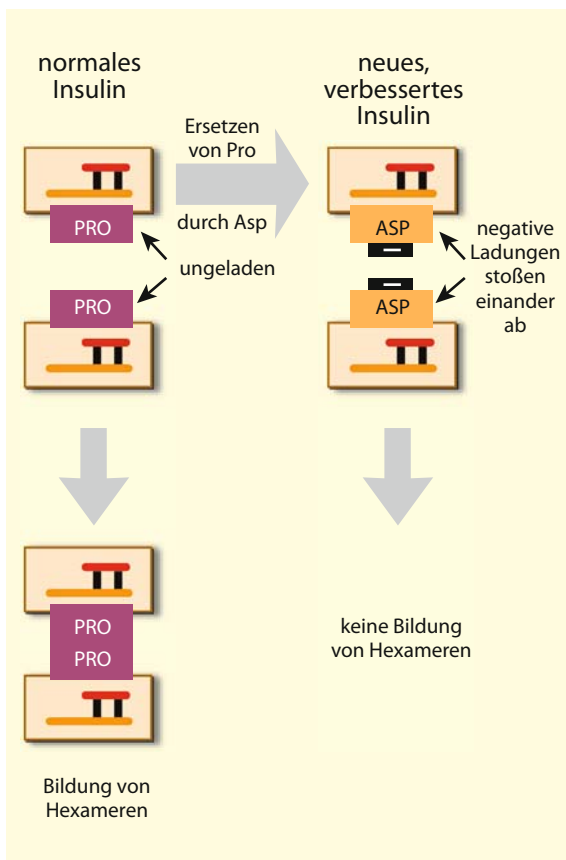
Dennoch ist natürliches Insulin, selbst natürliches menschliches Insulin, nicht perfekt, aber die Natur lässt sich verbessern. Als problematisch erweist sich, dass natürliches Insulin zur Bildung von Hexameren neigt. Durch dieses Verklumpen werden die Oberflächen verdeckt, mit denen das Insulinmolekül an den Insulinrezeptor bindet; so wird ein Großteil des Insulins daran gehindert, seine Zielzellen zu aktivieren (Abb. 19.19). *In vivo* wird Insulin von der Bauchspeicheldrüse als Monomer ausgeschüttet und rasch durch den Blutstrom verteilt, bevor Gelegenheit zum Verklumpen besteht. Bei der Injektion ist Insulin in der Spritze jedoch in hoher Konzentration vorhanden und kann verklumpen. Nach der Injektion braucht es eine Weile, bis die Hexamere wieder dissoziiert sind; daher kann es mehrere Stunden dauern, bis der Blutglucosespiegel des Patienten wieder auf eine normale Höhe sinkt.

Man kann Insulin genetisch so modifizieren, dass es nicht verklumpt. Durch Veränderung der DNA-Sequenz des Insulingens verändert sich auch die Aminosäuresequenz des resultierenden Proteins. Ein Prolinrest an der Oberfläche, wo die Insulinmoleküle bei der Bildung von Hexameren miteinander in Kontakt stehen, wird durch Asparaginsäure ersetzt, deren Seitenketten eine negative Ladung tragen. Nähern sich zwei derart modifizierte Insulinmoleküle einander an, werden sie gegenseitig von ihren negativen Ladungen abgestoßen und verklumpen nicht mehr (Abb. 19.20). Das modifizierte Insulin bewirkt ein schnelleres Absinken des Blutzuckerspiegels als das native Insulin. Im Jahr 1999 erhielt die dänische Pharmafirma Novo von der EU die Zulassung für dieses verbesserte Insulin. Vielleicht wird es irgendwann das natürliche Produkt ersetzen.



19.19 Insulin bildet Hexamere

In hoher Konzentration verklumpen die Insulinmonomere zu Hexameren. Dabei verkleben die Proteine über ihre Rezeptorbindungsstellen miteinander.



Zur Behandlung von Diabetes verwendetes Insulin wird heute als rekombinantes Protein in Bakterien hergestellt. Rekombinantes Insulin wird nicht als Prä-Proinsulin exprimiert, sondern in Form von zwei Minigenen. Durch Austausch des Prolinrestes gegen Asparaginsäure kann man verhindern, dass das rekombinante Insulin verklumpt.

Fettleibigkeit und Leptin

Der Fachbegriff für Fettleibigkeit, Adipositas, leitet sich von dem lateinischen Wort *adeps* für Fett ab. Starkes Übergewicht durch falsche Ernährung und die damit einhergehenden Konsequenzen haben sich in den Industrieländern fast epidemieartig ausgebreitet. In den USA geben Menschen jährlich zwölf Milliarden Dollar aus, um schlank zu werden (für Nahrungsmittel, Sportgeräte, Fettabsaugen etc.). Dennoch hat die US-Bevölkerung, im Vergleich zu den Bewohnern aller anderen Industrienationen, am stärksten mit Übergewicht zu kämpfen und wird immer fatter. Rund 35 Millionen Amerikaner sind so übergewichtig, dass ihre Gesundheit ernsthaft gefährdet ist. Die erhöhten Kosten für die Gesundheit belaufen sich auf rund 40 Milliarden Dollar pro Jahr – sind also mehr als dreimal so hoch wie der Kostenaufwand für Schlankheitsprodukte. Fettleibigkeit ist jedoch nicht nur eine Frage der Ernährung und mangelnder Bewegung, sondern hat auch genetische Ursachen.

Das **ob-Gen** (für engl. *obese* = fettleibig) codiert für das Protein **Leptin**. Mäuse, bei denen beide Kopien des *ob*-Gens schadhaft sind, bilden kein Leptin und

19.20 Modifiziertes, schnell wirkendes Insulin

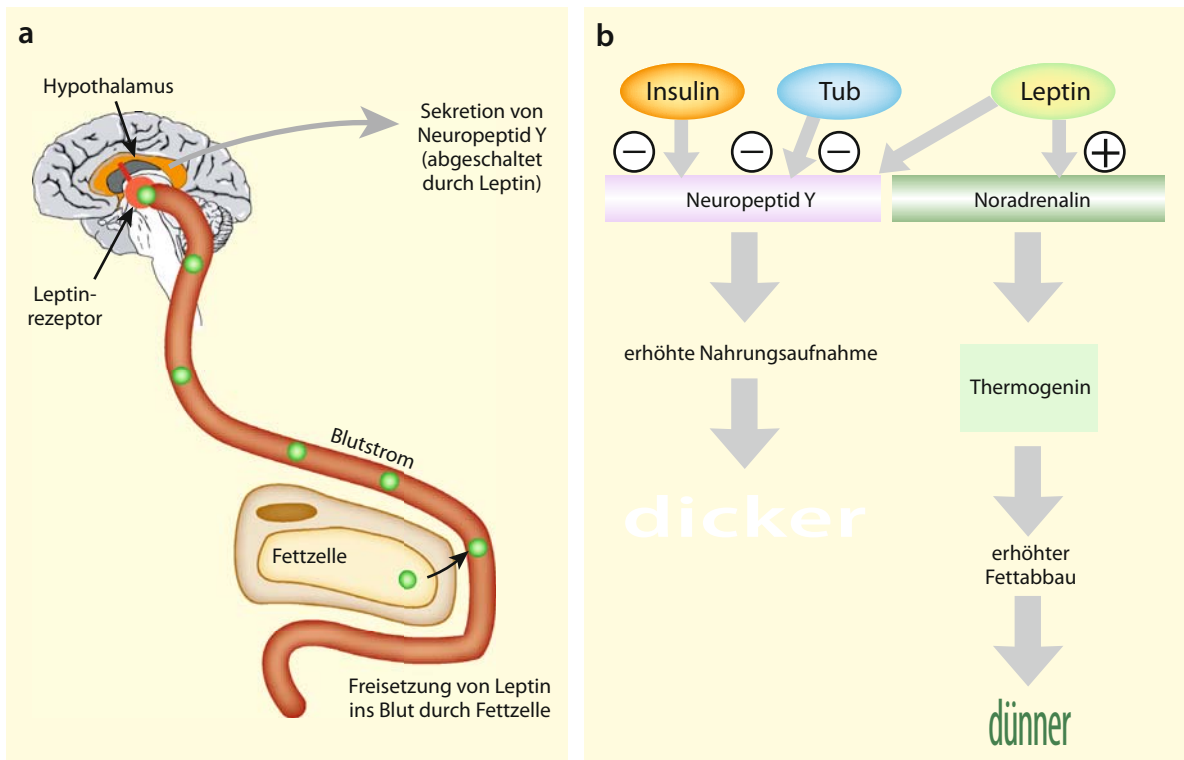
Natürliches Insulin weist eine klebrige Stelle um einen Prolinrest auf, die bewirkt, dass zwei Insulinmoleküle Dimere bilden, die sich schließlich zu Hexameren zusammenlagern. Daher hat man den Prolinrest gentechnisch durch einen Asparaginsäurerest ersetzt. Die negativen Ladungen stoßen sich gegenseitig ab und verhindern die Bildung von Hexameren.

werden bis zu dreimal so schwer wie normale Mäuse. Behandelt man fettleibige Mäuse mit Leptin, dann nehmen sie nicht nur weniger Nahrung zu sich, sondern verbrennen auch viel schneller Fett und können bis zu 30 % ihres Körpergewichts verlieren. Um menschliches Leptin und Leptin von Mäusen in großen Mengen herstellen zu können, hat man das Gen für diese Hormone in das Bakterium *E. coli* kloniert. Die Leptine der beiden Arten ähneln einander sehr und wirken in gleicher Weise auf fettleibige Mäuse.

Bei Versuchen an Menschen mit kloniertem menschlichen Leptin ergaben sich nur mäßige Wirkungen. Einige Testpersonen verloren innerhalb von sechs Monaten sechs Kilogramm. Bei extrem fettleibigen Menschen zeigt Leptin jedoch kaum Wirkung, was darauf schließen lässt, dass noch weitere Faktoren von Bedeutung sind. Leptindefekte führen fast von Geburt an zu einer ausgeprägten Fettleibigkeit; man spricht in diesem Fall von *krankhafter Adipositas*. Diese Erkrankung ist beim Menschen relativ

selten. Anders als bei fettleibigen Mäusen konnte man bislang nur bei wenigen Menschen nachweisen, dass ihre *ob*-Gene schadhafte sind und ihre Fettleibigkeit durch einen Leptinmangel hervorgerufen wird. Wahrscheinlich ist Leptin auch deshalb nicht verbreitet in Gebrauch, weil es durch Verdauungsenzyme abgebaut wird. Daher kann Leptin nicht oral aufgenommen, sondern muss täglich gespritzt werden.

Bei anderen fettleibigen Menschen sind andere Komponenten des Leptin-Regulationskreises defekt. Viele fettleibige Menschen weisen sogar höhere Leptinmengen auf als normal; bei ihnen liegt ein Defekt des **Leptinrezeptors** vor. Bei Mäusen, denen aufgrund einer Mutation des **db-Gens** der Leptinrezeptor fehlt, ist die Leptinkonzentration im Blut zweibis dreimal so hoch wie normal. Der Leptinrezeptor befindet sich an der Oberfläche von Hirnzellen, vor allem im Hypothalamus. Er bindet das im Blutstrom zirkulierende Leptin und leitet so das Signal ans Gehirn weiter (Abb. 19.21).



19.21 Leptin und der Leptinrezeptor

a Fettzellen produzieren Leptin und geben es an den Blutstrom ab. Das Hormon bindet an seinen Rezeptor im Hypothalamus, blockiert die Freisetzung von Neuropeptid Y und erhöht die Produktion von Noradrenalin. **b** Neuropeptid Y regt den Appetit an, während Noradrenalin den Fettabbau aktiviert. Insulin und Tub (für engl. „tubby“ = rundlich, dick; s. weiter unten) inhibieren ebenfalls die Sekretion von Neuropeptid Y.

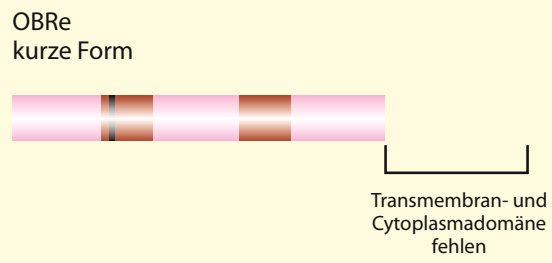
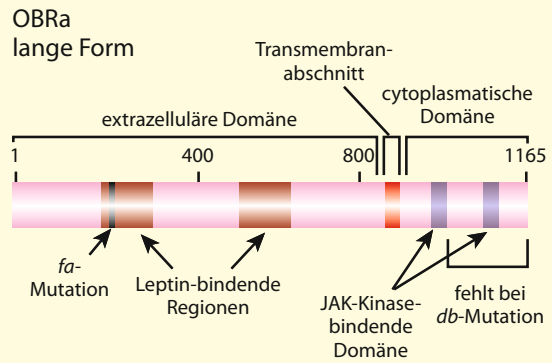
Exkurs 19.2

Fettleibig aufgrund einer Virusinfektion

Manche Menschen leiden von Geburt an unter Fettleibigkeit, andere durch eigenes Verschulden und bei wieder anderen wird sie – so bizarr es auch klingen mag – durch eine Virusinfektion verursacht. Zum ersten Mal festgestellt hat man dies bei übergewichtigen Hühnern in Indien, die mit einem oft tödlichen Adenovirus infiziert waren. Nach der Infektion setzten die überlebenden Hühner bis zu 75 % mehr Fett an. Das verwandte **Adenovirus-36** infiziert sowohl den Menschen als auch Hühner. Beim Menschen verursacht es Erkältungssymptome und Diarrhö. Bei einer Untersuchung von Menschen mit einem Gewicht von mehr als 110 Kilogramm zeigte sich, dass rund 15 % Antikörper gegen Adenovirus-36 in ihrem Blut aufwiesen, was auf eine Infektion mit diesem Virus irgendwann in der Vergangenheit schließen lässt. Fettleibige Menschen haben in der Regel eine höhere Konzentration von Cholesterin und Fett im Blut. Die Adenovirus-36-positive Gruppe wies jedoch einen geringeren Blutcholesterin- und Blutfettspiegel auf als normal. Das legt nahe, dass ihre Fettleibigkeit durch einen anderen Mechanismus zustande gekommen ist als bei der Mehrheit. Unter normalgewichtigen Menschen konnte man in nur sehr wenigen Fällen eine frühere Infektion mit Adenovirus-36 nachweisen. Auf welche Weise dieses Virus Fettleibigkeit begünstigt, ist noch nicht bekannt.

Durch die Bindung an seinen Rezeptor schaltet Leptin die Freisetzung von **Neuropeptid Y** durch das Gehirn ab. Neuropeptid Y steigert die Nahrungsaufnahme und lässt Tiere fatter werden. Zusätzlich regt Leptin die Ausschüttung von **Noradrenalin (Norepinephrin)** durch das Nervensystem an. Dieses bindet an **β 3-adrenerge Rezeptoren** an der Oberfläche von Fettzellen und signalisiert ihnen, Fett abzubauen. Bei einigen übergewichtigen Menschen hat man teilweise defekte **β 3-adrenerge Rezeptoren** gefunden.

Vom Leptinrezeptor ragt ein Schwanz ins Cytoplasma; dieser fungiert als Proteinkinase und ist für die Übertragung des Signals verantwortlich. Nach Bindung von Leptin wird eine Phosphotransferkaskade ausgelöst, die schließlich die Ausschüttung von Noradrenalin bewirkt. Durch alternatives Spleißen der mRNA für den Leptinrezeptor entstehen jedoch Proteine unterschiedlicher Länge (Abb. 19.22). Die längere **Isoform** wird im Hypothalamus gebunden



19.22 Alternative Formen des Leptinrezeptors

Vom Leptinrezeptor gibt es zwei Isoformen. Sie entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA des *db*-Gens. Die lange Form weist eine cytoplasmatische Domäne mit Proteinkinaseaktivität auf. Der kurzen Form fehlt diese Domäne.

und aktiviert die zahlreichen bereits beschriebenen Signalübertragungswege. Der kürzeren Isoform fehlt die cytoplasmatische Proteinkinasedomäne. Ihre Funktion ist unklar. Sie kann jedoch an Leptin binden und dafür sorgen, dass es die Blut-Hirnschranke überwindet. Wie schon erwähnt, fehlt *db*-Mutanten der Rezeptor völlig. Bei *fa*-Mutanten ist er hingegen vorhanden, sein signalübertragender Schwanz ist jedoch schadhaft. (Die ursprünglich bei Ratten entdeckte *fa*-Mutation befindet sich im *db*-Gen, das für den Leptinrezeptor codiert, *nicht* im *Fat*gen (engl. *fat*)).

Das vom *ob*-Gen codierte Hormon Leptin bindet an den Leptinrezeptor (codiert durch das *db*-Gen). Dieser aktiviert die intrazelluläre Kinasedomäne, um die Ausschüttung von Neuropeptid Y zu blockieren. Sind Leptin oder der Leptinrezeptor defekt, wird ständig Neuropeptid Y produziert, welches den Appetit anregt.

Fettleibigkeit wird durch zahlreiche Gene beeinflusst

Die Anreicherung von Fett wird durch viele Faktoren beeinflusst, darunter genetische Faktoren und Umweltfaktoren. In den meisten Fällen ist Fettleibigkeit nicht auf Defekte von Leptin oder seinem Rezeptor zurückzuführen. Dennoch hat die Entdeckung, dass zumindest einige Fälle von Fettleibigkeit überwiegend genetisch bedingt sind, Anlass zu zahlreichen Forschungen auf diesem Gebiet gegeben. In Tabelle 19.1 sind eine Reihe von Genen und Proteinen aufgelistet, die sich nachweislich auf das Körpergewicht auswirken.

Diese Liste enthält eine verwirrende Auswahl an Genen, die für Fettleibigkeit verantwortlich sein könnten, und ebenso eine große Zahl von potenziellen Zielen für die Entwicklung von Arzneimitteln. Unglücklicherweise wirkt sich eine Veränderung in irgendeinem der Faktoren tendenziell auf die Menge der anderen Komponenten des Regulationssystems aus. Infolgedessen ist es recht unwahrscheinlich, dass eine „magische Kugel“ gefunden wird, mit der man Fettleibigkeit unter Kontrolle bekommt. Wie genau das gesamte Kontrollnetzwerk funktioniert, müssen künftige Forschungen aufklären.

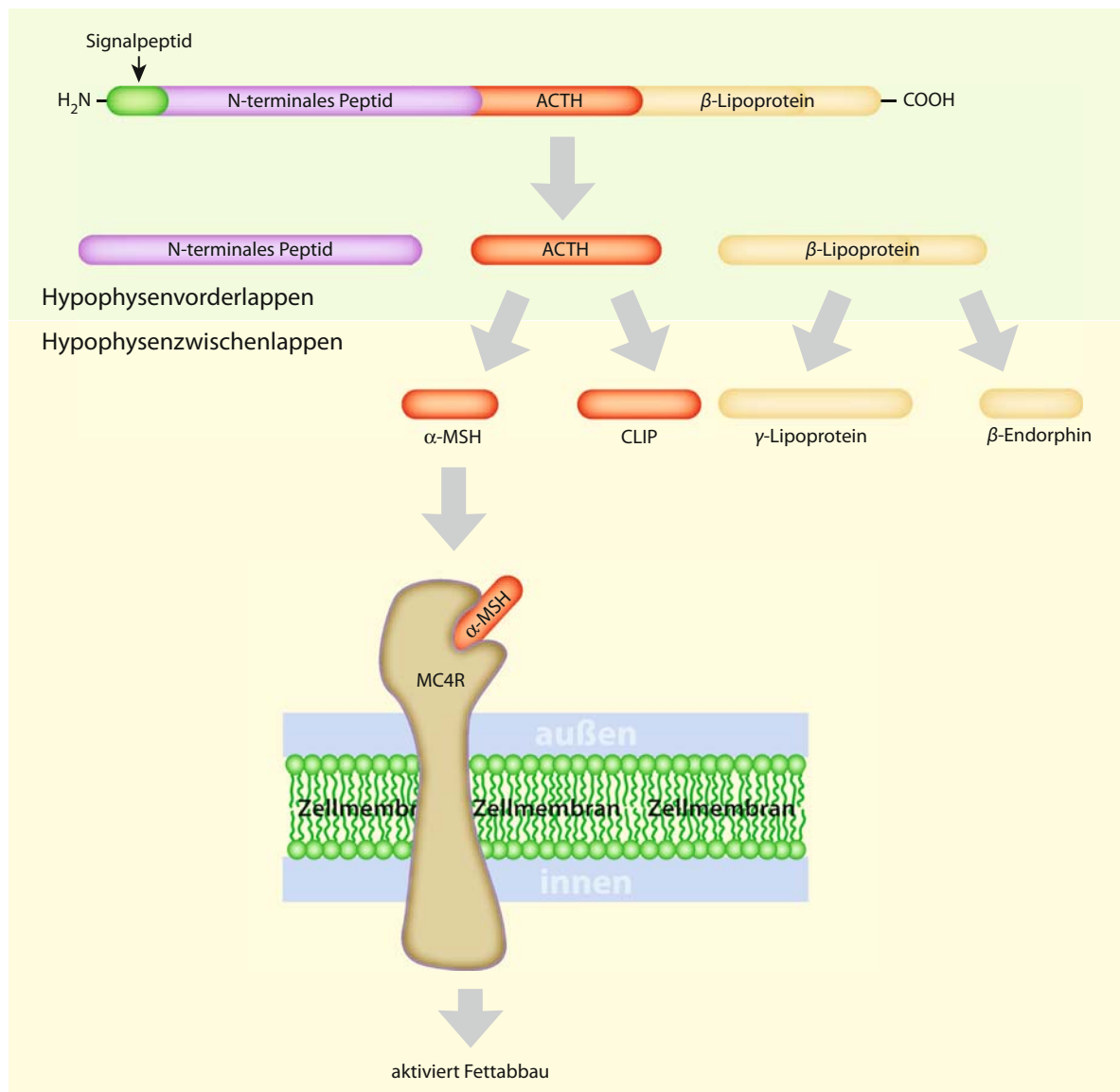
Insulin reguliert nicht nur den Blutzuckerspiegel, sondern erfüllt auch eine Funktion beim Fettstoffwechsel. Zudem finden sich Insulinrezeptoren auch

Tabelle 19.1 An der Entstehung von Fettleibigkeit beteiligte Gene und Proteine

Gen	codiertes Protein
<i>ob</i> (für engl. <i>obesity</i> = Fettleibigkeit)	Leptin
<i>db</i> (für Diabetes; bei Mäusen)	Leptinrezeptor
<i>fa</i> (für engl. <i>fat</i> = fett; bei Ratten)	Leptinrezeptor
<i>NPY</i>	Neuropeptid Y
<i>NPY1R-NPY5R</i>	Neuropeptid-Y-Rezeptoren; der NPY5R-Rezeptor ist für die Nahrungsaufnahme vermutlich am wichtigsten
<i>tub</i> (für engl. <i>tubby</i> = rundlich, dick)	Gehirnprotein, vermutlich ein Transkriptionsfaktor
<i>POMC</i>	Proopiomelanocortin, die Vorstufe von α -MSH (α -melanocytenstimulierendes Hormon, α -Melanotropin)
<i>MC4R</i>	Melanocortin-4-Rezeptor
<i>AGRP</i>	<i>agouti-related Protein</i> , Antagonist des Melanocortinrezeptors
<i>CART</i>	<i>cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i> (ein Neuropeptid)
<i>fat</i> (bei Mäusen)	Carboxypeptidase E (CPE)
<i>PCSK1</i>	Prohormon-Konvertase 1 (Protease)
<i>GHRL</i>	Ghrelin
<i>GHRL</i>	Obestatin
<i>GHSR</i>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor für Ghrelin
<i>GPR39</i>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor für Obestatin
<i>ADRB3</i>	β 3-adrenerger Rezeptor
<i>UCP1</i>	Thermogenin, UCP1 (<i>uncoupling protein 1</i>)
<i>UCP2</i>	UCP2 (<i>uncoupling protein 2</i>)
<i>UCP3</i>	UCP3 (<i>uncoupling protein 3</i>)
<i>AQP7</i>	Aquaporin 7

an einigen Gehirnzellen, sodass eine Verbindung besteht zwischen Insulin und der Kontrolle von Nahrungsaufnahme und Körperfett. Insulin zügelt die Nahrungsaufnahme durch die Regulation von Neuropeptid Y. Wie bereits ausgeführt, wird Insulin in Form der inaktiven Vorstufe Proinsulin ausgeschüttet; diese muss erst in Insulin umgewandelt werden,

um ihre Funktion zu erfüllen. Diese Umwandlung von Proinsulin in aktives Insulin erfolgt durch das Enzym Carboxypeptidase E. Bei Mäusen, die in der Fachsprache als „fett“ bezeichnet werden, findet sich ein genetischer Defekt an dem Gen für Carboxypeptidase E. Daher reichern diese Mäuse Proinsulin an. Sie ähneln damit vielen Menschen, da sie mit



19.23 Melanocortin und Melanocortinrezeptoren

Proopiomelanocortin (POMC) besitzt vier Domänen: Die N-terminale Sequenz aktiviert die Sekretion; das N-terminale Peptid mit unbekannter Funktion; die Adrenocorticotropin-(ACTH-)Domäne; und die β -Lipoproteindomäne, welche die Lipolyse aktiviert. Beim Übergang vom Hypophysenvorderlappen zum Zwischenlappen wird POMC in vier verschiedene Melanocortine prozessiert. Das α -MSH-Peptid bindet an den Melanocortinrezeptor MC4R und aktiviert den Fettabbau. Die anderen sind CLIP, γ -Lipoprotein und β -Endorphin.

zunehmendem Alter immer dicker werden; das verdeutlicht, wie eine geringere Insulinkonzentration zur Ansammlung von Fett beitragen kann.

Als weitere Regulatoren beeinflussen die **Melanocortine** (Abb. 19.23) den Fettstoffwechsel. Proopiomelanocortin (POMC) ist eine Proteinvorstufe, die bei Spaltung mehrere verschiedene Melanocortine ergibt. Von diesen wirkt sich α -Melanotropin (α -MSH, α -melanocytenstimulierendes Hormon) auf die Anreicherung von Fett aus. Es gibt mehrere verschiedene **Melanocortinrezeptoren**. Einer davon ist der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R), er wird von α -MSH zur Aktivierung des Fettabbaus benötigt. Defekte des POMC- oder MC4R-Gens können zu Fettleibigkeit führen. Wie die Kontrolle von Melanocortin mit anderen regulatorischen Faktoren in Wechselwirkung steht, ist noch umstritten.

Ein anderer Defekt liegt bei „rundlichen“ (engl. „tubby“) Mäusen vor: ein Defekt in dem *tub*-Gen, dessen Funktion noch nicht bekannt ist. Dieser Defekt sorgt für eine mäßige Anreicherung von Fett in höherem Alter. Das Tub-Protein findet sich im Hypothalamus, also in derselben Region des Gehirns, auf die auch Leptin abzielt. Offenbar reguliert es ebenfalls die Menge an Neuropeptid Y, aber über einen anderen Mechanismus als Leptin oder Melanocortin.

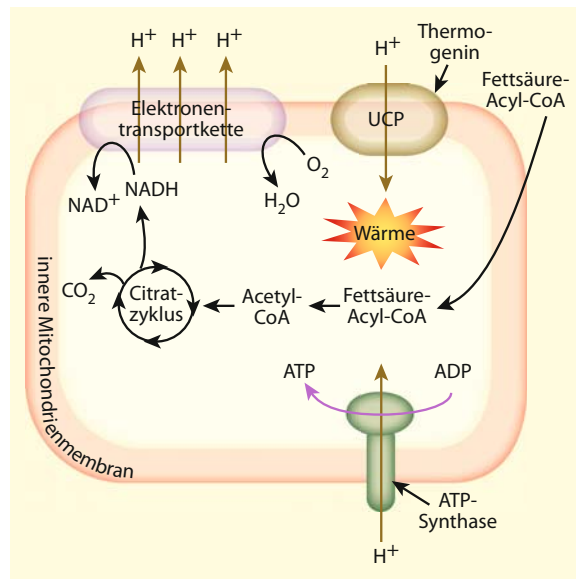
Ghrelin ist ein erst in jüngerer Zeit entdecktes Peptid aus 28 Aminosäuren, das sich nachdrücklich auf das Ernährungsverhalten auswirkt. Vor Mahlzeiten steigt die Menge an Ghrelin im Blut an, danach fällt sie wieder. Das deutet darauf hin, dass Ghrelin eine wichtige Rolle beim Signalisieren von Hunger spielt. Seinen Namen erhielt Ghrelin ursprünglich als „*growth hormone releasing factor*“, neben der Freisetzung von Wachstumshormon hat es jedoch auch noch andere Wirkungen und hemmt offenbar die Wirkung von Leptin. Injiziert man Ratten Ghrelin, so regt dies zu einer verstärkten Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme an. Das verwandte Peptidhormon Obestatin wirkt als Antagonist zu Ghrelin. Interessanterweise entstehen sowohl Ghrelin als auch Obestatin durch Prozessierung desselben Prohormons: Proghrelin.

Viele Proteine und Enzyme regulieren die Körpermasse. Die Regulationswege und die Auswirkungen dieser Defekte müssen noch genauer erforscht werden.

Insulin, Melanocortinrezeptor und Ghrelin stehen alle mit der Ansammlung von Fett und dem Fettstoffwechsel in Verbindung.

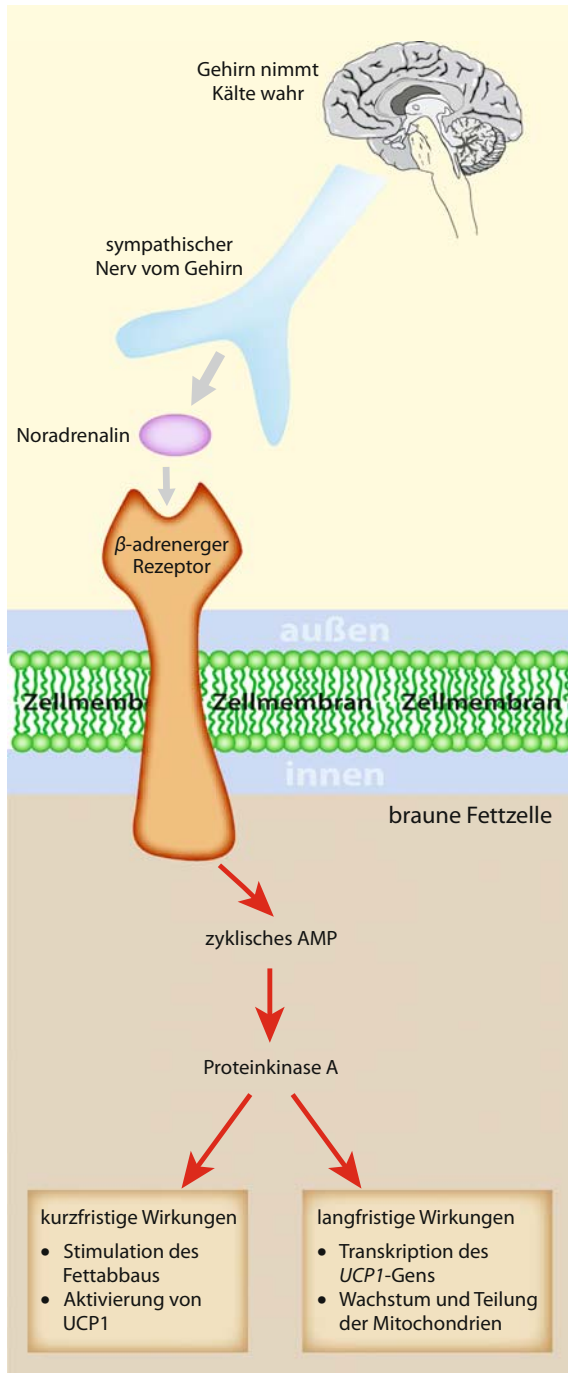
Fettabbau

Ein letztes entscheidendes Problem bildet der Abbau von Fett. Gespeichertes Fett besteht größtenteils aus Triglyceriden (d.h. Glycerin, verbunden mit drei Fettsäuren). In Adipocyten werden die Triglyceride zu Fettsäuren und Glycerin hydrolysiert. Die Fettsäuren werden dann in den Mitochondrien zu CO_2 oxidiert und liefern Energie. Normalerweise ist die Fettoxidation mit der Energieerhaltung durch die Atmungskette gekoppelt. Die Energie wird zur Erzeugung eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran verwendet, der zur Synthese von ATP dienen kann. Benötigt der Körper weniger Energie, so wird die Fettoxidation normalerweise gedrosselt. Bei der Verbrennung von überschüssigem Fett wird die freigesetzte Energie verschwendet; das erfordert die gezielte **Entkopplung** von der Atmungskette (Abb. 19.24). Dabei wird die verschwendete Energie in Form von Wärme frei.



19.24 Fettstoffwechsel und UCP

Fettsäuren werden zu Acetyl-CoA umgewandelt, das zur Oxidation in den Citratzyklus eingeht. Die frei werdende Energie ermöglicht der Elektronentransportkette schließlich, Protonen in den Raum zwischen den Membranen zu pumpen. Das erzeugt einen Protonengradienten, der die Synthese von ATP antreibt. Alternativ können die Protonen auch über Thermogenin (UCP, *uncoupling protein*) zurück über die Membran wandern; dadurch entsteht anstelle von ATP Wärme.



19.25 Kälte und UCP1

Wenn das Gehirn feststellt, dass der Körper unterkühlt ist, produziert es Noradrenalin. Dieses Hormon bindet an den β -adrenergen Rezeptor, der über zyklisches AMP und Proteinkinase A Signale weiterleitet. Dadurch wird die Zelle angeregt, die Produktion und Aktivierung von UCP1 (Thermogenin) zu erhöhen. UCP1 nutzt den Protonengradienten der Mitochondrien, um Wärme zu erzeugen.

Die sogenannten „Entkopplungsproteine“ (UCP, *uncoupling proteins*) finden sich in der inneren Membran der Mitochondrien, insbesondere in braunem Fettgewebe. Die Mitochondrien der braunen Fettzellen werden entkoppelt, wenn Tiere zu sehr auskühlen und mehr Körperwärme benötigen. Man kennt drei miteinander verwandte UCPs. UCP1 kommt normalerweise nur in braunem Fettgewebe vor und erhielt die Bezeichnung **Thermogenin**, weil es den Körper warm hält (Abb. 19.25). Wenn Noradrenalin an β -adrenerge Rezeptoren an der Oberfläche brauner Fettzellen bindet, wird das bereits vorhandene UCP1 rasch aktiviert. Zusätzlich erhöht derselbe Stimulus über einen längeren Zeitraum die Expression des UCP1-Gens und damit die Menge an UCP1-Protein. Knockout-Mäuse, denen UCP1 fehlt, sind kälteempfindlich, aber nicht fettleibig.

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass Rauchen schlank macht. Der hierbei aktive Faktor ist das **Nicotin** im Tabak. Nicotin erhöht nicht nur die Menge an UCP1 im braunen Fettgewebe, sondern induziert auch die Synthese von UCP1 in weißen Fettzellen, in denen es normalerweise fehlt. Außerdem zügelt Nicotin den Appetit.

UCP2 ist in den meisten Geweben vorhanden, UCP3 vor allem in der Muskulatur. Die Menge an UCP2 steigt, wenn Mäuse fettreiche Nahrung zu sich nehmen; das trägt vermutlich dazu bei, das Fett zu verbrennen. Mäuse, die keine größeren Mengen von UCP2 produzieren können, nehmen an Gewicht zu. Bestimmte Mutationen am UCP2- und UCP3-Gen, die beide nahe beisammen auf Chromosom 11 liegen, wurden mit Fettleibigkeit beim Menschen in Verbindung gebracht. Nach wie vor weiß man über die übergeordnete Regulation und Funktion von UCP2 und UCP3 noch sehr wenig.

Zu den merkwürdigen Feststellungen aus jüngerer Zeit zählt, dass ein Mangel an Aquaporin 7 Fettleibigkeit begünstigt. Wasser und Glycerin können zwar auch so durch Zellmembranen diffundieren, durch Aquaporine wird diese Bewegung aber enorm beschleunigt. Ohne Aquaporin 7 kann Glycerin die fettabbauenden Zellen nicht schnell genug verlassen. Folglich steigt die Menge an Triglyceriden, und das Fett wird nicht effizient abgebaut.

Beim Fettstoffwechsel wird in der inneren Mitochondrienmembran ein Protonengradient erzeugt. „Entkopplungsproteine“ (UCPs, *uncoupling proteins*) erzeugen mittels dieses Gradienten Körperwärme. Bestimmte Mutationen des UCP2- und UCP3-Gens stehen mit Fettleibigkeit in Verbindung.

Exkurs 19.3

Heilung aggressiver Mäuse durch ein Gen aus dem menschlichen Gehirn

Verhaltensanomalien des Menschen auf genetischer Ebene zu bekämpfen, erweist sich als schwierig. Vielversprechend ist der Ansatz, bei Mäusen Gendefekte zu finden oder zu erzeugen, die ähnliche Verhaltensänderungen wie beim Menschen auslösen. Die den menschlichen Genen entsprechenden Gene bei Mäusen kann man durch Gen-Knockouts direkt analysieren. Anschließend kann man überprüfen, ob sich durch das klonierte menschliche Gen die bei den Knockout-Mäusen auftretenden Defekte möglicherweise umkehren lassen.

Mutierte Mäuse, die durch eine pathologische Aggression gekennzeichnet sind, erhielten die Bezeichnung „*fierce mice*“. Bei einer Deletion beider Kopien des *NR2E1*-Gens (das für den Kernrezeptor 2E1 codiert)

entstehen ausgesprochen aggressive Mäuse mit anomaler Gehirnentwicklung. Ihr aggressives Verhalten ist von Dauer und maladaptiv: Die aggressiven Männchen töten häufig ihre Partnerinnen. Durch die klonierte menschliche Version des *NR2E1*-Gens lässt sich der Defekt bei der Gehirnentwicklung der aggressiven Mäuse nachweislich beheben und wieder ein normales Verhalten herstellen. Noch besteht keine Klarheit darüber, ob die Defekte am *NR2E1*-Gen auch für geistige Störungen beim Menschen verantwortlich sind. Es gibt einen Zusammenhang zwischen der bipolaren Störung und der Region 6q21-22, in der das *NR2E1*-Gen liegt. Diese Position auf dem Chromosom besetzen aber auch noch andere Kandidatengene.

Monoamin-Oxidase und Gewaltverbrechen

Zwischen Genetik und Verhalten bestehen komplexe Wechselwirkungen. Auch zwischen Stoffwechsel und Verhalten gibt es Überlappungen. Wie bereits angedeutet, sind die genetischen Auswirkungen auf Fettleibigkeit nicht ausschließlich physiologischer Art. Auch Mutationen in mehreren anderen Genen, die das Körpergewicht kontrollieren, wirken sich auf die Nahrungsaufnahme aus.

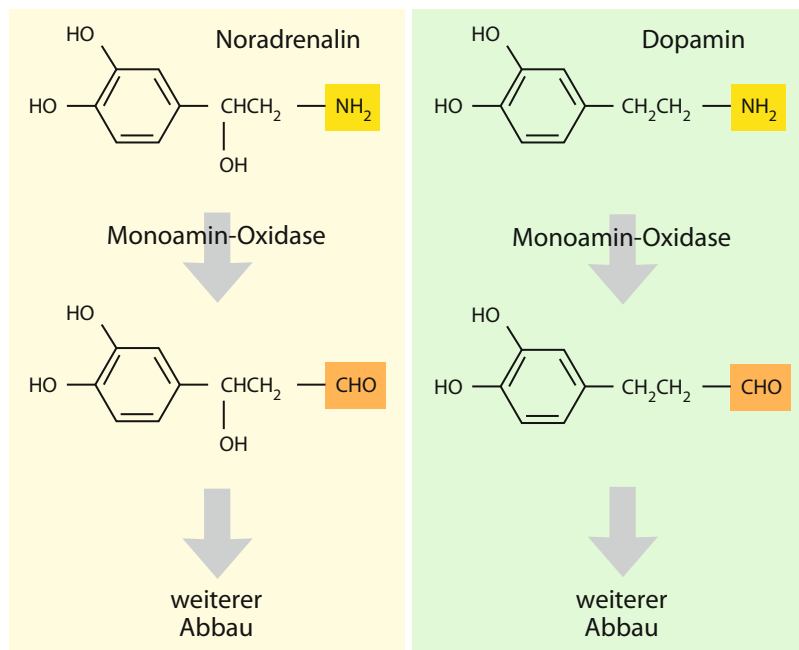
Lange Zeit waren die Informationen auf dem Gebiet der Verhaltensgenetik weitgehend statistischer Natur. Nach und nach kommen nun aber Zusammenhänge auf molekularer Ebene ans Licht. So scheint es eine Verbindung zwischen Gewalt und der Aufnahme des Neurotransmitters Serotonin zu geben. Man kennt verschiedene Allele des Gens für den Serotonintransporter; die Varianten mit geringerer Aktivität korrelieren mit aggressivem Verhalten.

Ein weiterer Zusammenhang besteht zwischen Gewaltverbrechen und der Aktivität von **Monoamin-Oxidase (MAO)** im Gehirn. Seit vielen Jahren schon ist bekannt, dass es einen statistischen Zusammenhang zwischen Gewalt und der in Blutplättchen festgestellten Menge an MAO gibt. Bei männlichen wie weiblichen Gewaltverbrechern findet sich eine geringere MAO-Aktivität. Vor kurzem

hat man nun für eine kleine Zahl von Extremfällen die zugrundeliegenden genetischen Störungen charakterisiert.

Signale zwischen Nervenzellen werden durch verschiedene chemische Neurotransmitter übertragen, die nach Empfang des Signals wieder abgebaut werden müssen. Monoamin-Oxidase A findet sich in der äußeren Membran der Mitochondrien von Neuronen und initiiert den Abbau von Neurotransmittern der Familie der **Catecholamine**: Dopamin, Adrenalin (Epinephrin) und Noradrenalin (Norepinephrin; Abb. 19.26). Das Gen für Monoamin-Oxidase A (MAO-A) liegt auf dem X-Chromosom. Man kennt Individuen mit Deletionen und Punktmutationen dieses Gens. Veränderungen des **MAO-A-Gens** führen zu erheblichen Abweichungen des Monoaminstoffwechsels und sind mit verschiedenen kognitiven Defiziten und Verhaltensänderungen bei Menschen und transgenen Mäusen assoziiert.

In den Niederlanden konnte ein Defekt der Monoamin-Oxidase A mit Gewalt unter den männlichen Vertretern einer Familie in Verbindung gebracht werden. Mehr als ein Dutzend Männer, die durch marginale geistige Retardierung und unkontrollierte Gewaltausbrüche charakterisiert waren, wiesen eine Punktmutation im achten Exon des MAO-A-Gens auf. Durch die Mutation wurde aus dem Codon für Gln (CAG) ein Stoppcodon (TAG), was zu einem verstümmelten Protein führte. Bei normalen Brüdern der gewalttätigen Männer



19.26 Abbau von Neurotransmittern durch Monoamin-Oxidase A

Monoamin-Oxidase A baut Noradrenalin ab, indem es die Aminogruppe in eine Aldehydgruppe umwandelt.

fand man diese Mutation des MAO-A-Gens nicht. Frauen, die gewalttätige Söhne hatten, besaßen ein normales und ein mutiertes Allel – wie erwartet bei einer geschlechtsgebundenen Störung. Bei den betroffenen Individuen stieg die Neurotransmittermenge deutlich über das normale Maß an, vor allem in Stresssituationen. Wahrscheinlich löst bei ihnen schon der geringste Stress eine unverhältnismäßige Reaktion aus.

Die Zahl schwerer MAO-A-Defekte ist ausgesprochen gering und wird kaum mehr als einen unbedeutenden Anteil am kriminellen Verhalten ausmachen. Andererseits kann man sich durchaus vorstellen, dass die allgemeine Korrelation zwischen MAO-Menge und Gewaltverbrechen auf genetische Veränderungen zurückzuführen ist, die eine leichte Reduktion der Monoamin-Oxidase-Aktivität bewirken. Dies bildet den Gegenstand weiterer Forschungen.

Bei einigen Gewaltverbrechern konnte man eine genetische Grundlage für ihr Handeln nachweisen. Defekte des Gens für Monoamin-Oxidase A konnten mit gewalttätigem Verhalten und leichter geistiger Retardierung in Zusammenhang gebracht werden.

► Weiterführende Literatur

- Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Grone-meyer H (2007) RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov* 6: 793–810
- Atkinson RL (2007) Viruses as an etiology of obesity. *Mayo Clin Proc* 82: 1192–1198
- Bian K, Ke Y, Kamisaki Y, Murad F (2006) Proteomic modification by nitric oxide. *J Pharmacol Sci* 101: 271–279
- Cary SP, Winger JA, Derbyshire ER, Marletta MA (2006) Nitric oxide signaling: No longer simply on or off. *Trends Biochem Sci* 31: 231–239
- Corthésy-Theulaz I, den Dunnen JT, Ferré P, Geurts JM, Müller M, van Belzen N, van Ommen B (2005) Nutri-genomics: The impact of biomics technology on nutri-tion research. *Ann Nutr Metab* 49: 355–365
- Craig IW (2007) The importance of stress and genetic varia-tion in human aggression. *Bioessays* 29: 227–236
- Hofbauer KG, Nicholson JR, Boss O (2007) The obesity epi-demic: Current and future pharmacological treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 565–592
- Josselyn SA, Nguyen PV (2005) CREB, synapses and memo-ry disorders: Past progress and future challenges. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 481–497
- Jun HS, Yoon JW (2005) Approaches for the cure of type 1 diabetes by cellular and gene therapy. *Curr Gene Ther* 5: 249–262

- Nogueira FT, Borecký J, Vercesi AE, Arruda P (2005) Genomic structure and regulation of mitochondrial uncoupling protein genes in mammals and plants. *Biosci Rep* 25: 209-226
- Palamara KL, Mogul HR, Peterson SJ, Frishman WH (2006) Obesity: New perspectives and pharmacotherapies. *Cardiol Rev* 14: 238-258
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C (2006) The human obesity gene map: The 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14: 529-644
- Reif A, Rösler M, Freitag CM, Schneider M, Eujen A, Kissling C, Wenzler D, Jacob CP, Retz-Junginger P, Thome J, Lesch KP, Retz W (2007) Nature and nurture predispose to violent behavior: Serotonergic genes and adverse childhood environment. *Neuropsychopharmacology* 32: 2375-2383
- Seftel AD (2005) Phosphodiesterase type 5 inhibitors: Molecular pharmacology and interactions with other phosphodiesterases. *Curr Pharm Des* 11: 4047-4058
- Yang W, Kelly T, He J (2007) Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol Rev* 29: 49-61

Altern und Apoptose

Zelluläre Seneszenz

Faktoren, welche die Seneszenz aktivieren

Korrelation zwischen Krebs und Altern

Während des Alterns verkürzen sich die Telomere

Mitochondrien und Altern

Lebensspanne und Stoffwechsel bei Fadenwürmern

Sirtuine, Histonacetylierung und Lebensspanne bei Hefe

Apoptose ist programmierter Zelltod

An der Apoptose ist eine proteolytische Kaskade beteiligt

Apoptose bei Säugetieren

Exekutionsphase der Apoptose

„Leichenbeseitigung“ bei der Apoptose

Kontrolle der Apoptosewege während der Entwicklung

Alzheimer-Krankheit

Programmierter Zelltod bei Bakterien

Behandlung von Krebs durch Auslösen der Apoptose

Weiterführende Literatur

Der Prozess des Alterns beginnt bereits bei der Geburt und hält bis zum Tod an. Manche Menschen scheinen sehr würdevoll zu altern, während bei anderen bereits sehr früh Anzeichen des Alterns erkennbar werden. Selbst wenn man tödliche Infektionskrankheiten und Unfälle unberücksichtigt lässt, ergeben sich bei der Lebensspanne von Menschen recht deutliche Unterschiede. Interessanterweise zeigen sich erhebliche Abweichungen der durchschnittlichen Lebensspanne bei Säugetierarten ähnlicher Größe. So werden Mäuse beispielsweise rund zwei bis drei Jahre alt, andere Nagetiere ähnlicher Größe erreichen hingegen im Schnitt ein Alter von fünf bis zehn Jahren. Alter ist also ein relativer Begriff mit Abweichungen innerhalb und zwischen Arten. Bis vor nicht allzu langer Zeit kannte man keine eindeutige molekulare Ursache für das Altern; es trat einfach als eine langsam zunehmende Abnutzung unserer Zellen, Gewebe, Organe und schließlich unseres gesamten Körpers zutage. Solange man noch keine Säugetierzellen im Labor kultivierte, war es unmöglich, die im Laufe der Zeit auftretenden molekularen Veränderungen zu verstehen. Viele Menschen versuchen die Zeichen des Alterns zu übertünchen und geben jede Menge Geld für Produkte aus, welche die sichtbaren Anzeichen angeblich beseitigen oder verbergen. Da überrascht es nicht, dass die Biotechnologieindustrie hofft, diesen Geldfluss ebenfalls anzapfen zu können, indem sie biologische Lösungen gegen das Altern findet.

Zelluläre Seneszenz

Kultiviert man normale adulte Zellen einer Maus oder eines Menschen in Petrischalen, so teilen sich diese Zellen über eine bestimmte Anzahl von Generationen hinweg und stellen dann die Teilung ein. Dann kann man selbst durch den Zusatz von wachstumsfördernden Stoffen nichts mehr bewirken. Die Zellen sterben aber nicht ab, solange sie ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden. Man spricht von der sogenannten **zellulären** oder **replikativen Seneszenz**. Die aus einem Säugetier isolierten Zellen haben eine innere Uhr, die das Eintreten der Seneszenz steuert. Menschliche Fibroblasten aus einem Fetus teilen sich in Kultur 60- bis 80-mal, Fibroblasten einer älteren Person dagegen nur 10- bis 20-mal. Die replikative Seneszenz hängt von der Zahl der Zellteilungen ab, nicht vom Kalender. Die erlaubte Zahl der Teilungen einer Zelle ist vorprogrammiert und wird nicht von zirkulierenden Hormonen

oder den umgebenden Geweben kontrolliert. Zudem teilen sich Zellen von Tieren mit kurzer Lebensspanne weniger häufig als Zellen von Tieren mit langer Lebensspanne. Daher korreliert die replikative Seneszenz mit der Lebensspanne des Organismus selbst.

Mit der replikativen Seneszenz sind drei wesentliche Merkmale verbunden. Erstens wird bei den alternenden Zellen der Zellzyklus in der G₁-Phase angehalten und tritt nicht mehr in die S-Phase ein (s. Kap. 4). Die Zellen zeichnen sich durch einen aktiven Stoffwechsel aus, produzieren also Proteine, erzeugen Energie und erfüllen ihre normalen Funktionen – aber sie replizieren nicht mehr ihre DNA und teilen sich nicht mehr. Zweitens werden viele **endgültig differenziert**. Mit anderen Worten, nach Abschluss der Zellteilungen spezialisiert sich die Zelle auf eine bestimmte Funktion. So teilen sich beispielsweise unreife Melanocyten, bis bei der Seneszenz die Alarmglocke läutet; dann stellen die Melanocyten die Teilung ein und produzieren Melanin, um das Hautgewebe vor Schäden durch Sonnenlicht zu schützen. Sowohl endgültig differenzierte als auch seneszente Zellen teilen sich nicht mehr, aber die endgültig differenzierten haben auch eine physiologische Veränderung durchgemacht. Zellen können altern, ohne ihre physiologische Funktion zu ändern. Schließlich werden die seneszenten Zellen resistent gegen Apoptose oder den programmierten Zelltod (s. weiter unten).

Interessanterweise gibt es bei der zellulären Seneszenz Unterschiede zwischen Arten. Im Labor wird häufig Gewebe von Mäusen verwendet, weil es problemlos zu beschaffen ist. Da Mäuse zu den Säugetieren gehören, lassen sich viele Parallelen zum Menschen ziehen. Bei der Kultur von Mäusezellen *in vitro* altert ein geringer Prozentsatz jedoch nie. Irgendwann übersteigt dann die Zahl der nicht alternenden Zellen die der seneszenten, und man erhält eine Petrischale mit unsterblichen Zellen. Solch ein Dem-Alter-Entrinnen wurde bei kultivierten menschlichen Zellen noch nie beobachtet.

Würden all unsere Zellen in das Stadium der Seneszenz eintreten, wäre keine Wundheilung oder Erholung von bakteriellen oder viralen Infektionen mehr möglich. Deshalb tritt bei einigen unserer Zellen keine Seneszenz ein. Während der Embryogenese und Entwicklung altern natürlich nur sehr wenige Zellen. Bei der Entwicklung enthält der Körper viele **Stammzellen**, unausgereifte oder Vorläuferzellen, aus denen dann differenzierte Zellen hervorgehen. Mit zunehmendem Alter nimmt die Zahl der Stammzellen ab, es verbleiben jedoch immer einige, um Gewebe wieder zu ergänzen, insbesondere die Haut, die Darm-

schleimhaut, Zellen des Immunsystems und Blutzellen. Neben den Stammzellen treten auch die Zellen der Keimbahn nicht in das Stadium der Seneszenz ein und behalten dauerhaft die Fähigkeit, sich bei Bedarf zu teilen. Ein weiteres Beispiel für nicht alternde Zellen sind Tumorzellen. Im Gegensatz zu Stammzellen und Keimbahnzellen ist bei Tumorzellen der Eintritt in die Seneszenz durch eine Mutation aufgehoben.

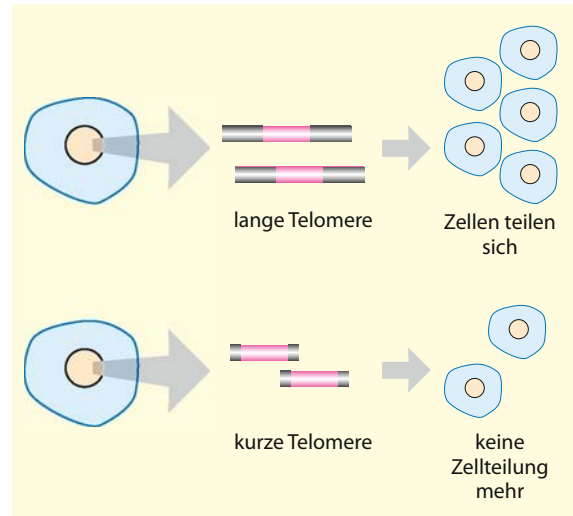
Als zelluläre Seneszenz bezeichnet man den Zustand einer Zelle, bei dem sie zwar noch am Leben ist, sich aber nicht mehr teilt. Einige seneszente Zellen sind endgültig differenziert und erfüllen im Organismus eine bestimmte Funktion. Seneszente Zellen sind resistent gegen Apoptose (programmierten Zelltod).

Faktoren, welche die Seneszenz aktivieren

Viele verschiedene Faktoren aktivieren die Seneszenz von Zellen und wurden deshalb mit dem Prozess des Alterns in Verbindung gebracht. Bei normalen Zellen kontrolliert die Länge der **Telomere**, ob Zellen altern oder nicht. Während der Replikation der Chromosomen kann DNA-Polymerase die DNA an den distalen Enden der Chromosomen nicht replizieren. Als Folge davon verkürzen sich die Chromosomen mit jeder Zellteilung (Abb. 20.1). Hat die Länge der Telomere eine kritische Verkürzung erreicht, treten die Zellen in das Stadium der Seneszenz ein.

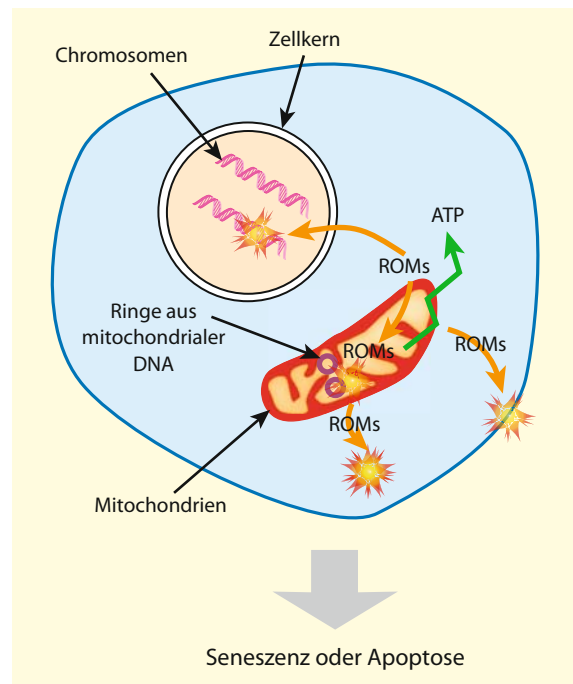
Als weiterer Faktor aktivieren DNA-Schäden die Seneszenz und könnten zum Alterungsprozess beitragen. Durch normale Stoffwechselaktivität entstehen verschiedene **reaktive Sauerstoffmetaboliten** (ROM, engl. *reactive oxygen metabolites*) (oder ROS/ Sauerstoffspezies), die Proteine, Lipide und die DNA angreifen. Diese Schäden akkumulieren bis zu einer bestimmten Schwelle. Danach tritt bei den Zellen, je nach Ausmaß und Schwere der Schäden, Seneszenz oder Apoptose ein (Abb. 20.2). Dadurch wird verhindert, dass sich im Körper stark geschädigte Zellen ansammeln.

Die zelluläre Seneszenz steht mit der Länge der Telomere und dem Umfang der DNA-Schäden aufgrund von reaktiven Sauerstoffmetaboliten in Zusammenhang.



20.1 Die Verkürzung der Telomere verursacht die zelluläre Seneszenz

Eine Zelle mit langen Telomeren kann sich kontinuierlich teilen und vermehren; eine Zelle mit kurzen Telomeren hingegen ist vielleicht nur noch in der Lage sich einmal zu teilen und tritt dann in das Stadium der Seneszenz ein.



20.2 DNA-Schäden aktivieren die Seneszenz

Durch mitochondriale Atmung wird ATP produziert, es entstehen aber auch reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROMs), die Zellbestandteile schädigen. Bei schweren Schäden kann die Zelle in die Seneszenz eintreten oder absterben.

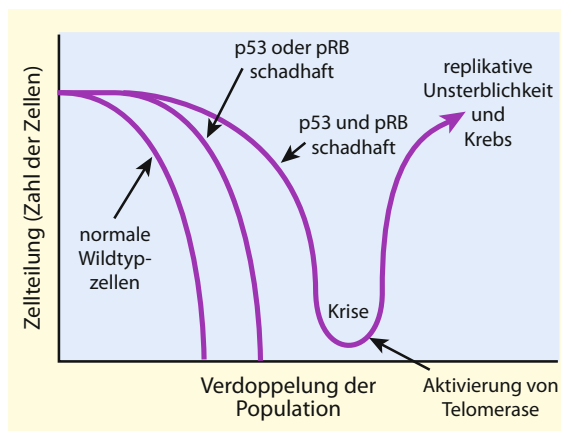
Korrelation zwischen Krebs und Altern

Als dritter wesentlicher Faktor wird zelluläre Seneszenz durch das Vorhandensein onkogener Mutationen aktiviert, die Krebs auslösen (zu Details s. Kap. 18). Als Verteidigungsmechanismus des Organismus opfern sich solche schadhafte Zellen selbst und starten das genetische Programm für die Seneszenz oder Apoptose, und es kommt zu einer **vorzeitigen Seneszenz**. Das wirft die Frage auf, warum Zellen ein Programm zur gezielten Seneszenz besitzen. Nach der vorherrschenden Theorie soll dies ganz einfach Krebs verhindern.

Für diese Theorie liegen drei entscheidende Beweise vor. Erstens enthalten bösartige Tumoren Zellen, die unsterblich sind und unendlich weiter wachsen, weil sie das normale Seneszenzprogramm umgehen. Zweitens umgehen oder blockieren Onkogene, die aus normalen Zellen maligne Zellen machen, häufig die Seneszenz und verlängern dadurch die Lebensspanne von Zellen. Drittens verhindert ein Verlust der Proteine **p53** oder **Retinoblastomprotein (pRB)**, dass eine Zelle in das Stadium der Seneszenz eintritt. Bei vielen Formen von Krebs liegt eine Mutation in einem oder beiden dieser Proteine vor, die beide an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind (s. Kap. 18).

Wenn p53 oder pRB defekt sind, durchlaufen die Zellen mehr Replikationszyklen als normal (Abb. 20.3). Sind sowohl p53 als auch pRB in Zellen schadhaft, so addiert sich die Wirkung, und die replikative Lebensspanne ist länger als bei Vorliegen von nur einer Mutation. Nach einer erhöhten Zahl von Zellteilungen tritt allerdings auch bei solchen Doppelmутanten schließlich die Seneszenz ein. Zellen besitzen also andere Mechanismen, um die Seneszenz auszulösen. Die Proteine p53 und pRB gelten als entscheidende Regulatoren der zellulären Seneszenz, weil sie die Ziele mehrerer viraler Onkogene sind.

Das Protein p53 aktiviert als Reaktion auf Stress mehrere Zellprogramme, darunter auch die zelluläre Seneszenz, Apoptose, Einstellung des Wachstums und DNA-Reparatur. Seine Expression ist streng reguliert, weil sich sowohl ein Überschuss als auch ein Mangel an p53 nachteilig auswirken. Als Transkriptionsfaktor reguliert p53 sein eigenes Gen ebenso wie verschiedene andere Gene. Vor allem aktiviert p53 die Transkription von Genen für die beiden anderen Regulatoren **PUMA** (für engl. *p53-upregulated mo-*



20.3 Bei Defekten von p53 und pRB erhöht sich die Lebensspanne von Zellen

Normale Zellen teilen sich für eine bestimmte Zeit und stellen dann die Teilung ein. Zellen mit Mutationen der Gene für p53 oder pRB teilen sich weiter und replizieren sich länger als normal. Sind sowohl p53 als auch pRB durch Mutationen geschädigt, so teilen sich die Zellen sogar noch länger. Irgendwann stellen aber letztlich auch die Mutanten die Teilung ein, sofern nicht eine weitere onkogene Mutation auftritt.

dulator of apoptosis) und **SLUG**. PUMA ist ein Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie, die Bax aktiviert, und fördert daher die Apoptose (s. den Abschnitt unten über Apoptose bei Säugetieren). Das Protein SLUG dagegen blockiert die Transkription von PUMA und wirkt der Apoptose entgegen. Das Gleichgewicht zwischen PUMA und SLUG bestimmt also die Entscheidung zwischen dem Versuch, eine geschädigte Zelle durch Einstellung des Wachstums plus DNA-Reparatur zu retten, oder der Eliminierung der Zelle durch Apoptose. Das Protein p53 spielt bei dieser Entscheidung zwischen Leben und Tod der geschädigten Zelle eine sehr komplizierte Rolle, die noch nicht gänzlich erforscht ist.

Bei einer Schädigung tritt eine Zelle früher in die Seneszenz ein. Schwer geschädigte Zellen begehen über Apoptose Selbstmord. Wenn geschädigte Zellen das Seneszenzprogramm umgehen und die Apoptose blockieren, bezeichnet man sie als Krebszellen.

Die Proteine p53 und pRB regulieren die Seneszenz. Mutationen dieser Gene machen die Zellen resistent gegen Seneszenz und lösen häufig Krebs aus.

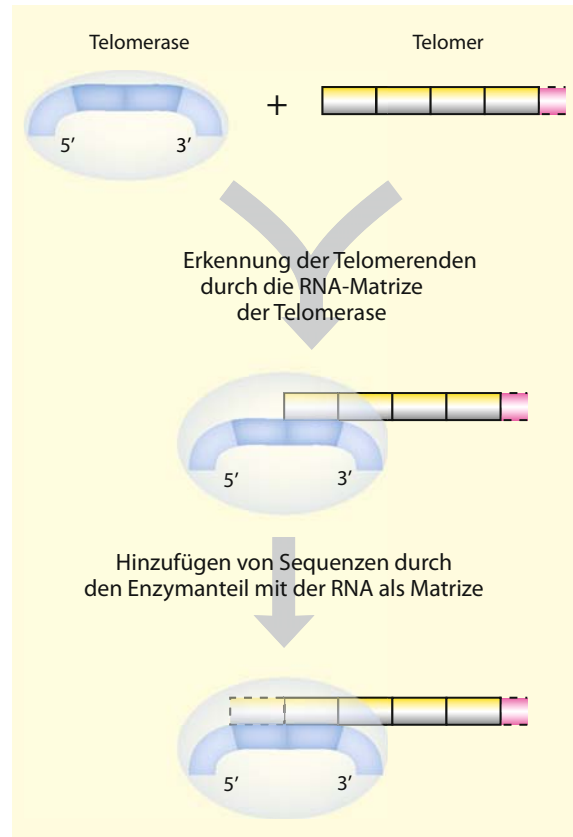
Während des Alterns verkürzen sich die Telomere

Dass alle Zellen normalerweise irgendwann in das Stadium der Seneszenz eintreten, impliziert, dass dieses Phänomen durch eine innere Uhr gesteuert wird. Vorzeitig ausgelöst werden kann der Alarm durch mutierte Onkogene; normalerweise ist dies jedoch erst der Fall, wenn die Telomere gefährlich verkürzt sind. Bei normalen menschlichen Chromosomen beträgt die Länge der Telomere 5–15 kb, während Telomere seneszenten Zellen 4–7 kb lang sind. Telomere sind hochrepetitive Sequenzen an den Enden eukaryotischer Chromosomen, die sich mit jeder Replikation der Chromosomen verkürzen (für Details hierzu s. Kap. 4). Daran sind Proteine gebunden; sie schützen die Enden der DNA vor der Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Dadurch würden die Enden verschiedener Chromosomen miteinander verbunden, was katastrophale Auswirkungen zur Folge hätte.

In einigen Zellen repariert das Enzym **Telomerase** die verkürzten Enden der Chromosomen (Abb. 20.4) durch Hinzufügen weiterer Sequenzwiederholungen an den Enden. Besonders aktiv ist Telomerase in Fortpflanzungszellen. Telomerase ist eine untypische Reverse Transkriptase aus zwei Bestandteilen, Protein und RNA. Das Protein katalysiert die Synthese neuer DNA, die RNA fungiert als Matrice.

In den meisten menschlichen Zellen ist die Telomeraseaktivität sehr gering; deshalb sind diese Zellen sehr anfällig für Seneszenz. Bei Mäusen herrscht hingegen in den meisten Zellen eine hohe Telomeraseaktivität, daher haben sie auch viel längere Telomere (ungefähr 40–60 kb). Diese Unterschiede treten in Zellkultur zutage. Mauszelllinien teilen sich vor dem Eintritt in die Seneszenz viel häufiger und werden manchmal spontan unsterblich. Durch gentechnische Modifikation hat man die RNA-Komponente der Telomerase von Mäusen eliminiert. Diese Mäuse erscheinen einige Generationen lang normal, obwohl sich die Telomere mit jeder Generation verkürzen, weil sie nicht mehr verlängert werden können. An einem kritischen Punkt der Telomerlänge treten bei den Mäusen Chromosomenfusionen sowie ein Anstieg der zellulären Seneszenz und Apoptose auf. Somit ähneln die Mäusezellen immer mehr menschlichen Zellen (die ohnehin im Allgemeinen schon kürzere Telomere aufweisen).

Die menschliche Erbkrankheit Dyskeratosis congenita (DKC; angeborene Dyskeratose) steht mit



20.4 Telomerase verhindert die Verkürzung der Telomere

Telomerase besteht aus einer Protein- und einer RNA-Komponente. Die RNA erkennt die Sequenzwiederholungen der Telomere, das Protein verlängert die Telomere.

einer geringeren Telomeraseaktivität in Zusammenhang. DKC-Patienten leiden unter anderem unter blockierten Tränenkanälen, Lernschwierigkeiten, Lungenerkrankung, Ergrauen der Haare und Haarverlust sowie Osteoporose. Interessanterweise handelt es sich bei vielen dieser Komplikationen auch um Symptome des Alterns. Das für DKC verantwortliche Gen codiert für ein Protein, das rRNA-Vorstufen im Nucleolus prozessiert. Bei DKC-Patienten war die Menge der RNA-Komponente der Telomerase sehr stark verringert, und die Telomere waren ungewöhnlich kurz. Vermutlich sind einige der Symptome von DKC auf die unzureichende Länge der Telomere zurückzuführen.

Auch bei Krebs ist die Länge der Telomere ein entscheidender Aspekt. Da sich Krebszellen über das normale Maß hinaus teilen, verkürzen sich ihre

Telomere extrem. Dies trägt zu der mit Krebs assoziierten genetischen Instabilität bei. Bei einem Tumor in fortgeschrittenem Stadium wird in den Zellen schließlich die Telomeraseaktivität angeschaltet und restabilisiert das Genom. Bis zu diesem Zeitpunkt können natürlich schon zahlreiche Umordnungen erfolgt sein.

Die Telomere verkürzen sich, weil DNA-Polymerase die Enden der Chromosomen nicht synthetisieren kann. In einigen Zellen können die Telomere durch das Enzym Telomerase wieder verlängert werden. Bei zu starker Verkürzung der Telomere treten die Zellen in das Stadium der Seneszenz ein. Wird die Seneszenz wie bei Krebs unterbunden, so werden die Chromosomen instabil, und es kommt zu Umordnungen und Verschmelzungen.

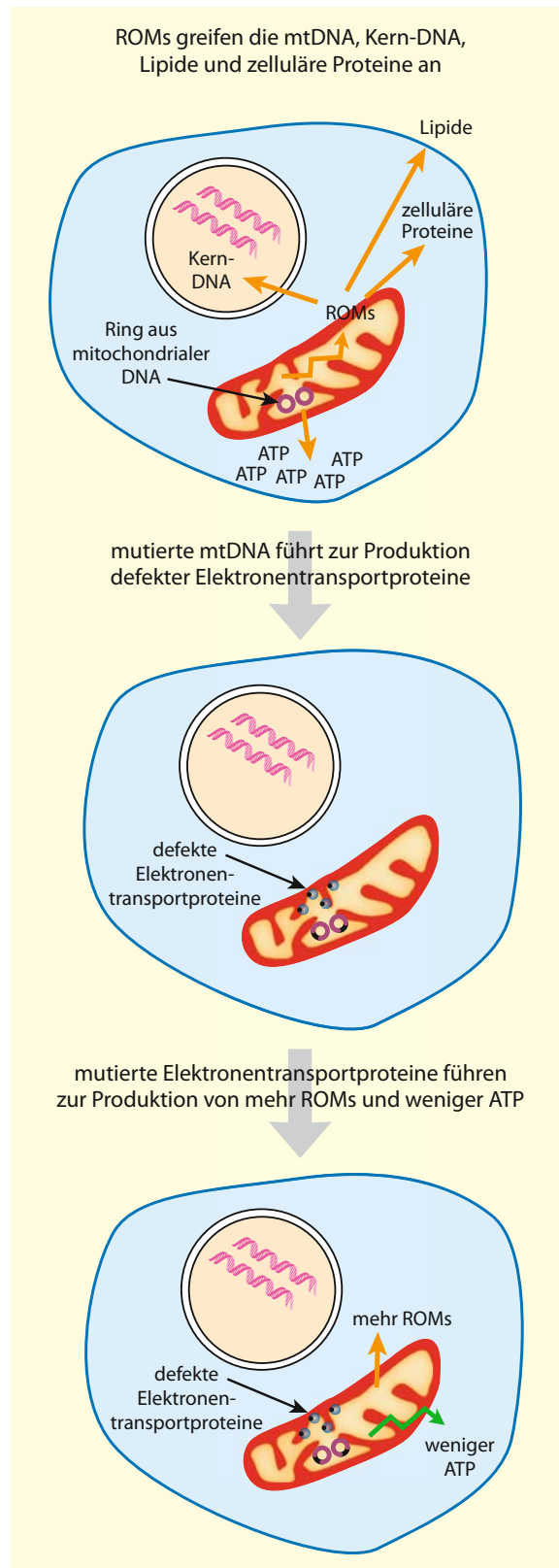
Mitochondrien und Altern

Wie bereits beschrieben, kann man zelluläre Seneszenz und Altern auf oxidativen Stress zurückführen. Tatsächlich halten viele Wissenschaftler Oxidationsschäden für die Hauptursache des Alterns. Die Mitochondrien spielen hierbei eine entscheidende Rolle, denn die meisten oxidierenden Radikale werden bei der aeroben Atmung gebildet. Kurzum, der mitochondriale Elektronentransport, durch den der größte Teil des ATP produziert wird, verbraucht ungefähr 85 % des Sauerstoffs. Durch partielle Reduktion des O_2 -Moleküls entstehen hochreaktive Spezies wie Superoxidionen ($\bullet O_2^-$), Peroxide (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($OH\bullet$). Diese reaktiven Sauerstoffmetabolite schädigen unspezifisch Proteine, Lipide und DNA (Abb. 20.5).

Mitochondriale DNA (mtDNA) bildet das Hauptziel für reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROMs), denn sie ist nicht durch Histone geschützt und befindet sich in der Nähe der Elektronentransportkette. Bei

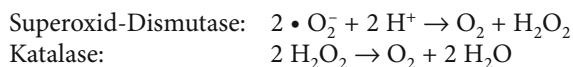
20.5 Durch oxidativen Stress werden umliegende Moleküle geschädigt

Reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROMs) greifen die mitochondriale DNA, zelluläre Proteine, Lipide und die Kern-DNA an. Geschädigte mtDNA kann zur Produktion mutierter Atmungskettenproteine führen, die wiederum mehr ROMs und/oder weniger ATP produzieren.



Oxidation der mtDNA können sich in den Genen für die Energieproduktion Mutationen auf der mtDNA ansammeln. Daraus kann eine fehlerhafte Elektronentransportkette resultieren. Daher produzieren die Mitochondrien weniger Energie, und die Prozesse der Zelle verlangsamen sich. Zudem können defekte Elektronentransportproteine noch mehr ROMs produzieren, welche die mtDNA noch weiter schädigen – ein Teufelskreis. Es sei daran erinnert, dass jedes Mitochondrium mehrere Kopien seines Genoms aufweist, jede Zelle viele Mitochondrien enthält und jedes Gewebe aus zahlreichen Zellen besteht. Also müssen sich Schäden aus vielen Ereignissen ansammeln, damit ihre Auswirkungen erkennbar werden. In metabolisch besonders aktiven Zellen reichern sich Oxidationsschäden rascher an.

Als Antioxidantien wirkende Enzyme können die Auswirkungen von oxidativem Stress abschwächen. Davon gibt es mehrere mit unterschiedlichen Funktionen. Die beiden bekanntesten sind **Superoxid-Dismutase (SOD)** und **Katalase**. Von der SOD existieren zwei Formen mit unterschiedlichen Metallionen im aktiven Zentrum. Cu/Zn-SOD findet sich hauptsächlich im Cytoplasma, Mn-SOD in den Mitochondrien. SOD wandelt Superoxidionen in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid um. Katalase bewirkt die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser.



Behandelt man den durchscheinenden Nematoden *Caenorhabditis elegans* mit einem Antioxidans, erhöht sich seine Lebensspanne signifikant – um nicht weniger als 54 %. Diese Fadenwürmer zeigten keine geringere Körpergröße oder verringerte Fruchtbarkeit. Das lässt darauf schließen, dass es kaum zu einer unspezifischen Reduktion des Stoffwechsels kam. Weitere Untersuchungen an der Taufliege *Drosophila melanogaster* stützen diese Ansicht. Die Zugabe von Antioxidantien zur Nahrung von *Drosophila* wirkt sich unterschiedlich auf die durchschnittliche Lebensspanne aus. Vitamin E (α -Tocopherol, ein Radikalfänger) erhöhte beispielsweise die Lebensspanne um 13 %, Vitamin C zeigte dagegen keinerlei Wirkung. Wie sich in drei Studien ergab, verlängert das Antioxidans Thioprolin die Lebensspanne. Allerdings erwies sich seine Wirkung als äußerst variabel (eine Verlängerung von 6–30 %). Gentechnisch modifizierte Fliegen

mit einem zusätzlichen Gen für SOD oder Katalase zeigten keine Veränderung der Lebensspanne. Bei Fliegen mit drei Kopien des SOD- oder Katalasegens verlängerte sich die Lebensspanne um ein Drittel – vermutlich aufgrund der geringeren Oxidationsschäden.

Da Stoffwechsel und Oxidation mit dem Altern in Zusammenhang stehen, sollten sich bei einer gedrosselten Stoffwechselrate weniger Schäden ansammeln, und der Organismus sollte länger leben. Eine Abnahme der Körpertemperatur senkt die Stoffwechselrate, wie sich bei wechselwarmen Tieren oder Winterschläfern zeigt. Solche Tiere können über einen längeren Zeitraum ausschließlich von ihrem gespeicherten Körperfett leben, indem sie die Herzfrequenz verringern und den Stoffwechsel verlangsamen. Eine reduzierte körperliche Aktivität senkt die Stoffwechselrate ebenfalls, genau wie eine Einschränkung der Nährstoffzufuhr. Um diese Hypothese zu überprüfen, setzte man Mäuse auf eine kalorienreduzierte Diät. Dadurch verringerten sich der Blutglucose- und der Insulinspiegel. Außerdem zeigten die Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Insulin und hatten eine geringere Körpertemperatur. Ebenfalls untermauert wurde die Theorie, dass eine Einschränkung der Kalorienzufuhr Oxidationsschäden verringert, durch die Tatsache, dass sich in den Mitochondrien der Nager weniger reaktive Sauerstoffmetaboliten nachweisen ließen und im Laufe des Lebens der Tiere weniger Oxidationsschäden auftraten. Die stärkste Auswirkung zeigte sich im Gehirn und in der Skelettmuskulatur, beides Gewebe mit hohen Stoffwechselraten.

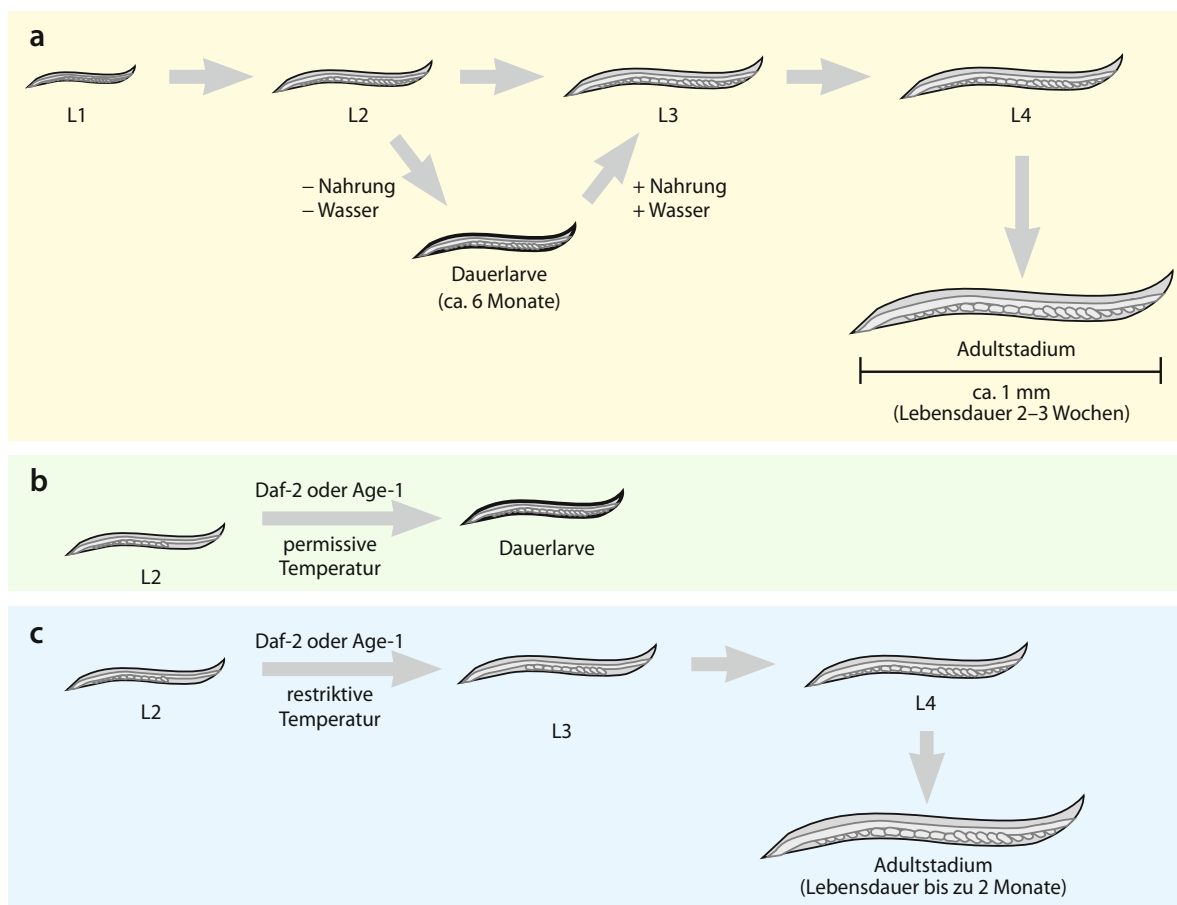
Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse bleibt noch festzustellen, ob Antioxidantien die Lebensspannen aller Organismen verlängern können. Zur Oxidation von Proteinen oder DNA und dem daraus folgenden Altern des Organismus können viele Faktoren beitragen. Erst durch weitere Forschungen wird sich ergeben, welche Rolle jeder dieser Faktoren genau spielt.

Durch partielle Reduktion von Sauerstoff entstehen reaktive Sauerstoffspezies. Diese greifen die mitochondriale DNA und die Enzyme der Elektronentransportkette an, die sich beide in direkter Umgebung der Sauerstoffreduktion befinden. Verringern lassen könnten sich diese Schäden an den Zellen durch eine eingeschränkte Kalorienzufuhr oder durch Zugabe von Enzymen, die als Antioxidantien wirken und die Zahl der ROMs reduzieren.

Lebensspanne und Stoffwechsel bei Fadenwürmern

Durch Untersuchungen an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnte man feststellen, welche Rolle der Stoffwechsel und die Ernährung beim Altern spielen. Normalerweise erreicht dieser Fadenwurm ein Alter von zwei bis drei Wochen. Es sind mehrere Mutationen bekannt, durch die sich die Lebensspanne des Nematoden verlängert und/oder der Eintritt in das Stadium der sogenannten **Dauerlarve**, das dem Überdauern ungünstiger Lebensbedingungen

dient, ausgelöst wird (Abb. 20.6). Normalerweise durchlaufen diese Nematoden vor dem Adultstadium vier Larvenstadien. Bei Nahrungs- oder Wassermangel gehen sie in das Dauerstadium über. Als Schutz vor Austrocknung bilden sie eine dickere Cuticula; Mund und After werden verschlossen, sodass keine Nahrungsaufnahme möglich ist. Die Dauerlarve nimmt keine Nahrung auf und bewegt sich nicht, bis sie durch Reize wie Nahrung und Wasser stimuliert wird. Einige Mutationen der Gene *daf-2* und *age-1* induzieren den Übergang zur Dauerlarve. Viele dieser Mutationen sind **temperatursensitiv**, d.h. die Mutation wird nur bei höheren Temperaturen in vollem Umfang exprimiert. Andere Mutationen an *daf-2* oder *age-1* verlängern die Lebensspanne um



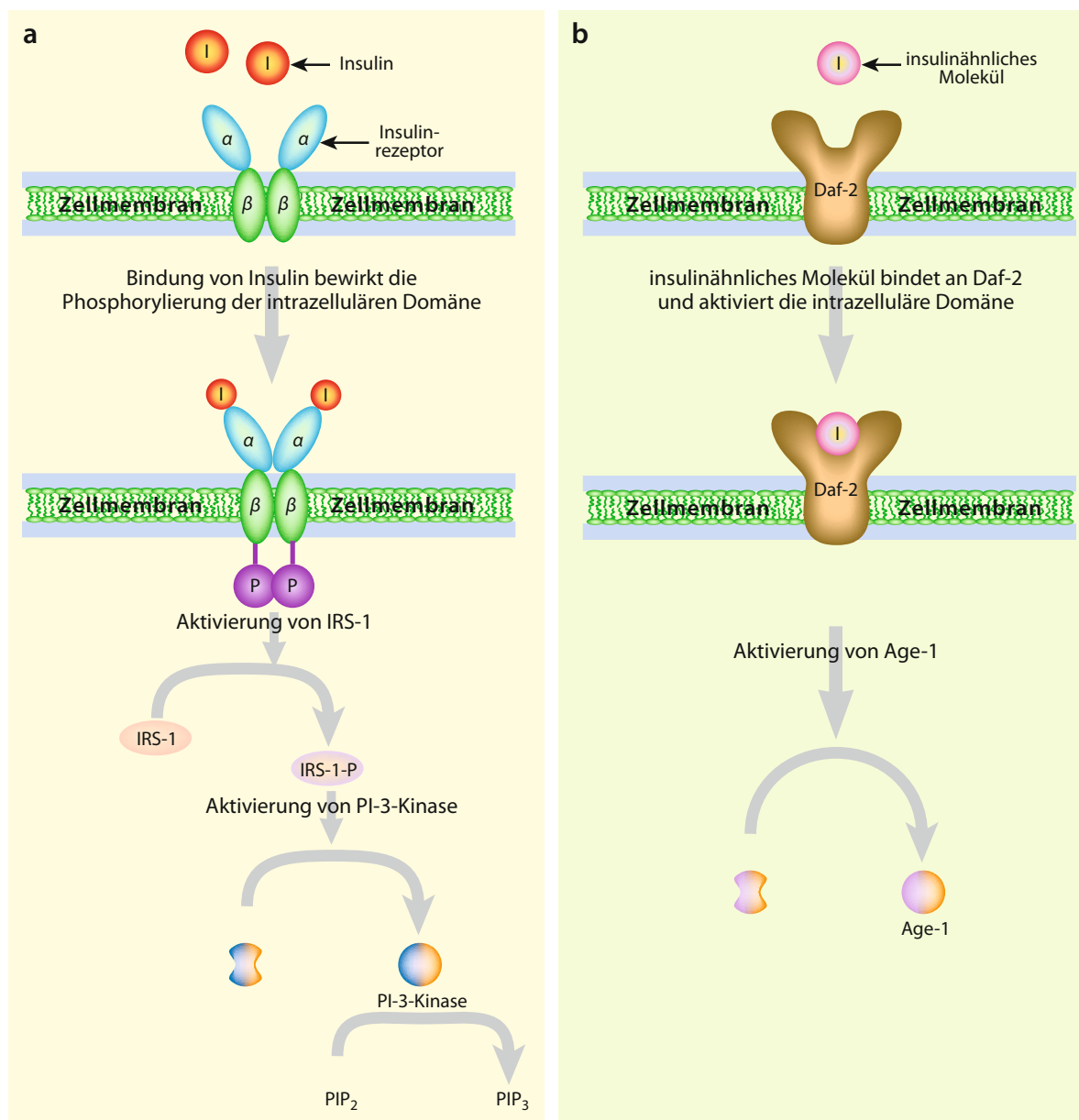
20.6 Auswirkungen der Gene *daf-2* und *age-1* auf Lebensspanne und Ruhezustand von *C. elegans*

a Normale Nematoden durchlaufen vor dem Adultstadium vier Larvenstadien und leben unter Normalbedingungen etwa zwei bis drei Wochen. Sind die Larven des Stadiums L2 Hunger ausgesetzt, so können sie bis zu sechs Monate als Dauerlarven überstehen. **b** Durch einige Mutationen an *daf-2* oder *age-1* treten die Würmer unabhängig von ihrem Ernährungszustand in das Dauerlarvenstadium ein. **c** Andere *daf-2*- oder *age-1*-Mutationen lösen nicht das Dauerlarvenstadium aus, verlängern aber die Lebensspanne.

bis zu zwei Monate, ohne ein Dauerlarvenstadium zu induzieren.

Die Proteine Daf-2 und Age-1 regulieren beide die Stoffwechselrate (Abb. 20.7). Sequenzdaten zufolge codiert *age-1* bei dem Fadenwurm für ein Homolo-

gon der katalytischen Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), und *daf-2* codiert für ein Homologon des Insulinrezeptors. Die Homologa dieser beiden Proteine bei Säugetieren sind an der Insulinsignalübertragung beteiligt (s. Kap. 19). Ist dieser



20.7 Insulinsignalübertragung beim Menschen und bei *C. elegans*

a Bei Bindung von Insulin an den menschlichen Insulinrezeptor wird die intrazelluläre Domäne durch Phosphorylierung aktiviert. Die Phosphatgruppe wird über IRS-1 auf PI-3-Kinase übertragen (s. Kap. 19); diese wandelt das Lipidmolekül Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP₂) durch Übertragung einer Phosphatgruppe in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) um. PIP₃ löst die intrazelluläre Reaktion auf Insulin aus. **b** Bei Fadenwürmern bindet das Daf-2-Protein an ein insulinähnliches Molekül und aktiviert das Age-1-Protein. Dieses Protein ähnelt der PI-3-Kinase von Säugetieren.

Übertragungsweg beim Menschen beeinträchtigt, entwickelt sich Typ-2-Diabetes („Altersdiabetes“). Die Mutationen der Gene *daf-2* und *age-1* bei dem Fadenwurm blockieren das vom insulinähnlichen Rezeptor (engl. *insulin-like receptor*) übertragene Signal. Analog zum System beim Menschen wirken sich die Mutationen bei dem Wurm vermutlich auf den Glucosespiegel aus, verringern die Stoffwechselrate und verlängern somit die Lebensspanne. Gestützt wird dies durch die Beobachtung, dass *daf-2*- und *age-1*-Würmer geringere Stoffwechselraten als Wildtypwürmer und eine höhere Resistenz gegen Oxidationsschäden zeigen.

Einige andere Mutationen verlängern ebenfalls die Lebensspanne von *C. elegans*. Den betroffenen Genen hat man die Bezeichnungen *clk* und *gro* gegeben (für engl. *clock* bzw. *growth rate* – aufgrund der anomalen Funktion biologischer Uhren und der anomalen Wachstumsrate). Diese Mutationen verlängern die Embryonalentwicklung und die postembryonale Entwicklung des Fadenwurmes und damit letztendlich dessen Lebensspanne. Der gesamte Entwicklungsprozess verläuft mit Verzögerung. Im Gegensatz zu den Mutationen von *daf-2* und *age-1* zeigen die von *clk* oder *gro* absolut keine Auswirkungen auf die Bildung der Dauerlarven. Das engste Homologon von CLK-1 ist ein Hefeprotein, das an der Regulation des Wachstums beteiligt ist. Es ermöglicht den Zellen, von einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle wie Glucose auf eine nichtfermentierbare umzusteigen. Das Hefeprotein kontrolliert die Synthese des an der mitochondrialen Atmung beteiligten Elektronenüberträgers Ubichinon. Erneut ist die Ursache für die Verlängerung der Lebensspanne von *C. elegans* eine veränderte Stoffwechselrate. Die Mitochondrien von *clk*-Mutanten setzen geringere Mengen reaktiver Sauerstoffmetaboliten frei, sodass der Alterungsprozess verlangsamt wird.

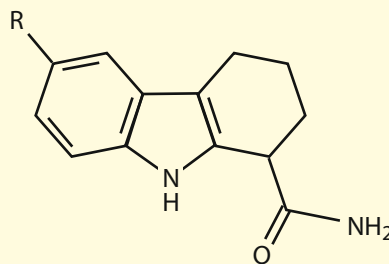
Die Gene *daf-2* und *age-1* codieren bei *C. elegans* für Proteine, die Proteinen des Insulinstoffwechsels ähneln. Mutationen dieser Gene bewirken eine verlängerte Lebensspanne der Fadenwürmer oder den Eintritt in das Dauerlarvenstadium. Dadurch kann sich die Lebensspanne erhöhen, weil die Mutationen die Stoffwechselrate des Nematoden herabsetzen.

Mitochondrien der *clk*-Mutanten von *C. elegans* setzen geringere Mengen reaktiver Sauerstoffmetaboliten frei, sodass die einzelnen Entwicklungsstadien der Fadenwürmer jeweils länger dauern als normal.

Sirtuine, Histonacetylierung und Lebensspanne bei Hefe

Obwohl es sich bei Hefe um einen einzelligen Eukaryoten handelt, kann man bei ihr zwei verschiedene Formen des Alterns beobachten: **replikatives Altern** und **chronologisches Altern**. Replikatives Altern betrifft sich teilende Zellen und wird anhand der Zahl der Tochterzellen bemessen, die eine Mutterzelle hervorbringen kann. Chronologisches Altern wird durch Nährstoffmangel ausgelöst. Wie lange eine Zelle leben kann, ohne sich zu teilen, bestimmt ihr chronologisches Alter.

Auf das Altern bei Hefe wirkt sich das Sir2-Protein aus, ein Vertreter der Sirtuinfamilie von Histon-Deacetylasen. (Es sei daran erinnert, dass die Genexpression bei Eukaryoten eine Umgestaltung der Nucleosomen beinhaltet, die wiederum vom Ausmaß der Histonacetylierung beeinflusst wird.) Hefezellen, denen Sir2 fehlt, zeichnen sich durch eine längere chronologische Lebensspanne aus, durch eine geringere Mutationsrate der DNA sowie durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Stressbedingungen wie Hitzeschock und oxidativen Stress. Das Homologon zu Sir2 bei Säugetieren, SirT1, kontrolliert den Glucose- und Fettstoffwechsel. Säugetierzellen ohne das *sirt1*-Gen überleben in Kultur länger, transgene Mäuse ohne dieses Gen haben einen geringeren Körperfettgehalt und werden älter. Sir2 ist also in die bereits beschriebenen Reaktionen zur Einschränkung der Kalorienzufuhr verwickelt.



20.8 Sirtuininhibitoren

Mehrere auf dem Indolring basierende Verbindungen wurden mittels Hochdurchfluss-Screening (engl. *high-throughput screening*) als potenzielle Sirtuininhibitoren identifiziert. Der Indolkern besteht aus einem Benzolring, fusioniert mit einem fünfgliedrigen stickstoffhaltigen Ring. Als Seitenkette bzw. Rest (R) kommen bei den verschiedenen Vertretern H, CH₃ oder Cl vor.

Exkurs 20.1

Biotechnologische Tipps für ein längeres Leben

Zwar kann der Mensch seine Lebensspanne nicht durch das Ausschalten von Genen verlängern, es bieten sich aber verschiedene weniger drastische Maßnahmen an, welche die Chancen auf ein längeres Leben erhöhen.

Man sollte weniger essen und dadurch insgesamt die Produktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten, die Anreicherung von Fetten in Blutgefäßen und andere Probleme verringern. Bei Tieren hat sich bei einer eingeschränkten Ernährung eine signifikante Verlängerung der Lebensdauer ergeben. Menschen mit Übergewicht haben hingegen eine geringere Lebenserwartung.

Man sollte mehr Antioxidantien zu sich nehmen, um dadurch die reaktiven Sauerstoffmetaboliten zu bekämpfen. Leuchtend gefärbtes Obst und Gemüse enthält gewöhnlich hohe Mengen davon, ebenso Kaffee, dunkle Schokolade und Rotwein. Man kann auch violette Kar-

toffeln und andere außergewöhnlich gefärbte Sorten bekannter Gemüse ausprobieren.

Man sollte in Maßen Alkohol trinken – Menschen, die zwei bis drei Gläser pro Tag trinken (bei Frauen eines bis zwei) leben länger als Abstinenzler und starke Trinker. Einer Hypothese zufolge wirkt Alkohol ganz einfach als Lösungsmittel und trägt dazu bei, Fettablagerungen in den Blutgefäßen aufzulösen. Andere Hypothesen gehen davon aus, dass auch komplexe regulatorische Effekte auf den Stoffwechsel eine Rolle spielen (was bislang aber nicht nachgewiesen ist).

Man sollte sich ein Haustier zulegen. Selbst nicht-transgene Katzen und Hunde senken den Blutdruck ihrer Besitzer. (Das wurde tatsächlich direkt gemessen – und ist echte Wissenschaft, kein Großstadtmythos!)

Als potenzielle Medikamente gegen das Altern werden nun Inhibitoren der Sirtuine entwickelt. Eine der daran beteiligten Biotechnologiefirmen ist Elixir Pharmaceuticals. Sie haben als spezifische und potente Sirtuininhibitoren eine Reihe modifizierter Indole entwickelt (Abb. 20.8). Sirtuine entfalten ihre Wirkung durch Übertragung einer Acetylgruppe vom Histon auf NAD, wodurch O-Acetyl-ADP-ribose plus Nicotinamid entstehen. Die auf Indolen beruhenden Sirtuininhibitoren binden nach Freisetzung des Nicotinamids und verhindern die Freisetzung des Histons und der O-Acetyl-ADP-ribose.

Sirtuine sind Deacetylasen, die Acetylgruppen von Histonen abspalten. Sind diese Proteine defekt, verlängert sich die Lebensspanne von Hefezellen, kultivierten Säugetierzellen und Mäusen.

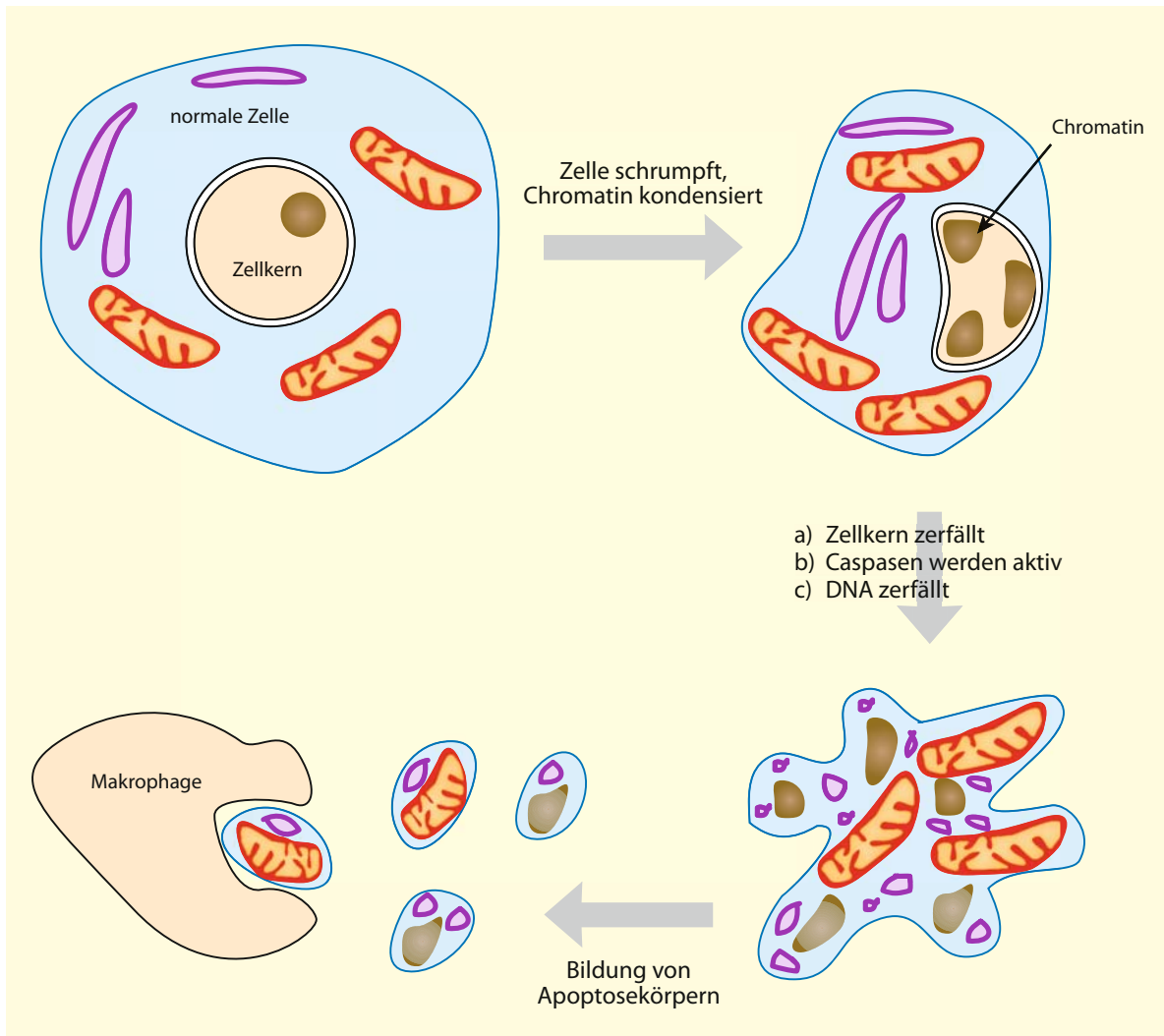
Apoptose ist programmierter Zelltod

Haben Sie sich jemals gefragt, was mit dem Schwanz einer Kaulquappe passiert, wenn sie sich in einen Frosch umwandelt, oder mit all den zusätzlichen weißen Blutkörperchen, wenn man eine Infektion überstanden hat? Was passiert mit seneszenten Zel-

len, die geschädigt sind und nicht mehr repariert werden können?

An all diesen Vorgängen ist die sogenannte **Apoptose** beteiligt, der **programmierte Zelltod**. Der Schwanz und die Schwimmhäute der Kaulquappen fallen nicht einfach ab. Vielmehr macht jede Zelle des Schwanzes einen programmierten Zelltod durch. Dadurch können sämtliche Proteine, Lipide und Nucleotide der Wiederverwendung zugeführt werden. Wenn ein Mensch krank wird, produziert sein Immunsystem zur Abwehr der Infektion neue Zellen. Würden diese zusätzlichen Zellen nach erfolgreicher Bekämpfung der Infektion einfach platzen und absterben, müsste der Körper ein ziemliches Durcheinander beseitigen. Stattdessen aber aktivieren die Zellen Gene, die ein kontrolliertes, gezieltes Todesprogramm initiieren. Die Apoptose erfolgt in geregelter Weise, jeder Schritt dieses Prozesses wird von Genen gesteuert. Nur wenige oder gar keine Cytoplasmabestandteile werden freigesetzt. Sämtliche Überbleibsel werden von benachbarten Zellen aufgenommen und alle Bestandteile werden wiederverwertet.

Während der Apoptose durchlaufen die absterbenden Zellen einen morphologisch eindeutigen, deutlich erkennbaren Prozess. Zum ersten Mal beschrieben wurde dieser 1972, aber erst in den letzten zehn Jahren hat man ihn genetisch analysiert. Zunächst beginnt die Zellmembran Bläschen zu bilden, die sich auswölben (Abb. 20.9). Der Zellkern schrumpft, kondensiert und zerfällt in kleinere Fragmente. Schließlich schrumpft die gesamte Zelle,



20.9 Apoptose

Zu Beginn der Apoptose schrumpft die Zelle, und das Chromatin kondensiert. Anschließend werden die Fragmente des Zellkerns und andere zelluläre Bestandteile durch Enzyme abgebaut, die man Caspasen nennt. Zum Schluss werden die kondensierten Apoptosekörper von Makrophagen aufgenommen.

und es bilden sich große kondensierte Fragmente, die man als **Apoptosekörper** bezeichnet. Andere Zellen nehmen diese durch Phagozytose auf und beseitigen so die Überreste. Die Proteine, Lipide und Nucleinsäuren werden gespalten und wiederverwertet.

Apoptose unterscheidet sich deutlich von anderen Formen des Zelltods. Bei Beschädigung von Zellen durch äußere Verletzungen, Sauerstoffmangel oder unzureichende Energieversorgung sterben Zel-

len durch **Nekrose** ab. Nekrotische Zellen schwellen an, weil ihr osmotisches Gleichgewicht gestört ist. Ihre Proteine werden denaturiert und abgebaut. Schließlich platzt die Zelle und stirbt. Nekrose ist eine sehr chaotische Form des Zelltods und löst häufig eine Immunreaktion aus. Gegenüber diesen Formen des Zelltods hat die Apoptose viele Vorteile. Das schrittweise ablaufende Programm ermöglicht den Zellen, falls notwendig, den Prozess anzuhalten. Zudem ändert sich durch das Endresultat nicht die Phy-

siologie des gesamten Organismus. Bei der Nekrose können die platzenden Zellen erhebliche Schäden an benachbarten Geweben anrichten und die Situation so noch verschlimmern. Das Immunsystem muss das Chaos beseitigen, die Gewebe müssen repariert und ersetzt werden. Im Gegensatz dazu löst die Apoptose keine Immunantwort aus, sofern die Zellen nicht als Reaktion auf eine Infektion durch Viren oder Bakterien absterben.

Apoptose ist ein organisierter und effizienter Vorgang des Zelltods.

An der Apoptose ist eine proteolytische Kaskade beteiligt

Der erste gut dokumentierte Fall einer Apoptose wurde an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* beobachtet. Dieser kleine Fadenwurm lebt normalerweise im Boden und ernährt sich von Bodenbakterien. In der Entwicklungsgenetik dient er als Modellorganismus, weil er problemlos zu halten ist, vier Entwicklungsstadien aufweist und zudem durchscheinend ist. Mithilfe eines speziellen Mikroskops, des **Nomarski- oder Differenzial-Interferenzkontrastmikroskops**, kann man jede Zelle von *C. elegans* sichtbar machen (Abb. 20.10). Mittels dieser Technik konnten Wissenschaftler jede Zellteilung von der einzelligen Eizelle bis zum adulten Tier genau verfolgen. *C. elegans* bildet im Laufe seiner Entwicklung 1090 Zellen, der adulte Fadenwurm besteht jedoch lediglich aus 959 Zellen – die anderen 131 Zellen sterben durch Apoptose ab.

Man identifizierte zahlreiche mutierte Nematoden, bei denen die Zahl der Zellen bei den Adulten mehr oder weniger als 959 betrug, wie beim Wildtyp üblich. Bislang konnten vier Gene charakterisiert werden, die an der aberranten Apoptose beteiligt sind. Drei davon sind *ced-3*, *ced-4* und *ced-9* („*ced*“ steht für engl. *cell death abnormal* – anomaler Zelltod), das vierte ist *egl-1* (für engl. *egg laying defective* – gestörte Eiablage). Wenn die Gene *ced-3*, *ced-4* oder *egl-1* defekt sind, besteht ein adulter Fadenwurm aus mehr als 959 Zellen. Also initiieren diese Gene das Apoptoseprogramm oder bewirken seine Durchführung. Ist das Gen *ced-9* schadhaft, sind weniger als



20.10 Differenzial-Interferenzkontrastaufnahme eines adulten *Caenorhabditis elegans*

Das Nomarski-Interferenzkontrastmikroskop verwandelt Dichteunterschiede in Kontrastunterschiede und ergibt ein plastisches Bild, das wie ein dreidimensionales Relief wirkt. Die Technik eignet sich besonders zur Visualisierung von Geweben, die aus mehreren Zellschichten bestehen. Mit freundlicher Genehmigung von Jill Bettinger, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA.

959 Zellen vorhanden; das deutet darauf hin, dass mehr Apoptose als normal stattgefunden hat. Das Protein CED-9 inhibiert also die Apoptose.

Die CED- und EGL-Proteine sind Bestandteile einer Kaskade, die den Zelltod auslöst. Genauer gesagt aktiviert ein Protein das nächste Protein und dieses wiederum weitere Proteine. Anhand von genetischen und biochemischen Experimenten hat man folgendes Modell für die Apoptose bei *C. elegans* erstellt (Abb. 20.11). Die drei CED-Proteine bilden einen inaktiven Komplex in der Membran der Mitochondrien. Ein Signal von den Zellen der Umgebung aktiviert die Synthese des Proteins EGL-1. EGL-1 bindet an CED-9 und löst es von dem Komplex ab. Dadurch wird CED-4 aktiviert, eine Protease, die spezifisch eine kleine inhibitorische Domäne vom Ende von CED-3 abspaltet. Aktiviertes CED-3 bildet ein Heterotetramer aus zwei kleinen und zwei großen Domänen. Dieses verdaut wiederum verschiedene zelluläre Proteine durch Spaltung nach Asparaginsäureresten. Diese Enzymform bezeichnet man als **Caspase** (für engl. *cysteiny-l-aspartate specific protease*) (s. Exkurs 20.2). CED-3 spaltet nach seiner Aktivierung inhibitorische Domänen von anderen Proteasen, Nucleasen und anderen Caspasen ab und bewirkt so die Ausführung des Apoptoseprogramms.

Exkurs 20.2

Caspasen

Caspasen sind Proteasen, die ihre Zielproteine nach bestimmten Asparaginsäureresten spalten. Die Spezifität ergibt sich durch das Erkennen der vier Aminosäurereste, die auf die Asparaginsäure folgen. Man kennt viele verschiedene Caspasen. Sie wurden während der Evolution in hohem Maße konserviert und finden sich bei Säugetieren, Fliegen, Nematoden und selbst bei Süßwasserpolypten (*Hydra*). Wissenschaftler schreiben ihnen eine zentrale Rolle zu, weil sie bei der Apoptose das Todesurteil vollziehen. Tatsächlich lässt sich durch eine Hemmung der Caspasen die Apoptose verhindern.

Man nimmt an, dass Caspasen ihre Funktion in Form von Heterotetrameren erfüllen, also einer Aggregation von vier Domänen (Abb. A). Die meisten Caspasen von Säugetieren bestehen aus zwei p20-Domänen und zwei p10-Domänen. Die p20-Domäne enthält das aktive Zentrum des Enzyms. Daher kann jede aktive Caspase zwei verschiedene Proteine gleichzeitig spalten. Die inaktive Form einer Caspase enthält drei unterschiedliche Domänen: die Prodomäne, die das aktive Zentrum blockiert, eine p20-Domäne und eine p10-Domäne.

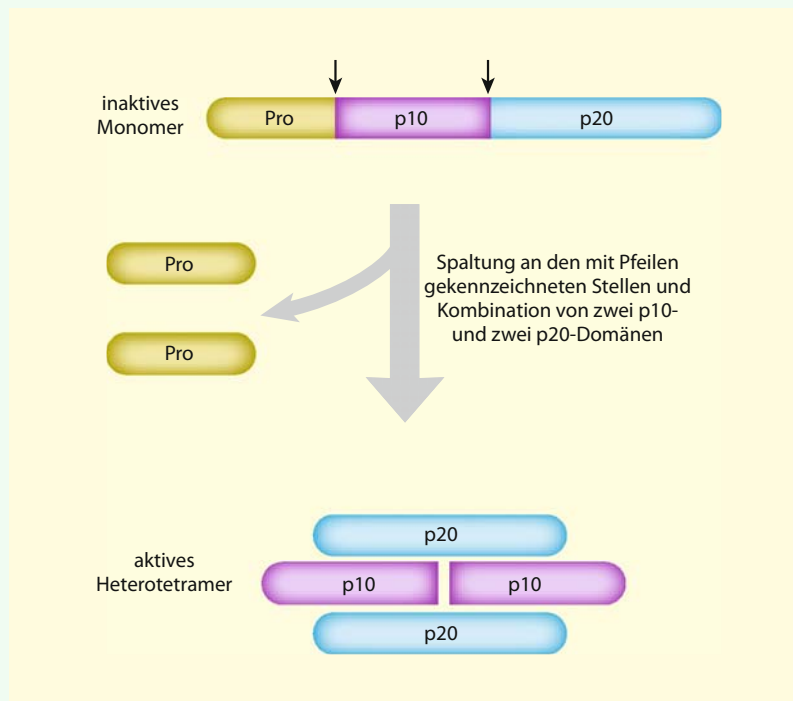
Caspasen können auf drei Wegen aktiviert werden (Abb. B). Für die erste Methode ist eine weitere, zuvor aktivierte Caspase erforderlich; sie spaltet zwischen der Prodomäne und p20 sowie zwischen p20 und p10. Nach

Spaltung der beiden Moleküle lagern sich die p20- und p10-Domänen zu ihrer endgültigen Struktur zusammen. Die zweite Methode der Caspasenaktivierung erfolgt über eine Selbstassoziation. Wenn beispielsweise drei Moleküle Caspase-8 trimerisieren, spaltet eine Caspase-8 ihren Nachbarn. Wurden zwei Moleküle der Triade gespalten, dissoziieren sie vom dritten und bilden das Heterotetramer. Dieser Mechanismus dient zur Aktivierung der Caspasekaskade beim Todesrezeptorweg der Apoptose (s. weiter unten). An der dritten Methode sind spezifische regulatorische Proteine beteiligt, bei denen es sich nicht um Caspasen handelt. Wenn sich im Laufe der Apoptose in den Mitochondrien das Apoptosom bildet (s. weiter unten), binden die beiden regulatorischen Proteine Apaf-1 und Cytochrom c daran und initiieren die Spaltung von Caspase-9.

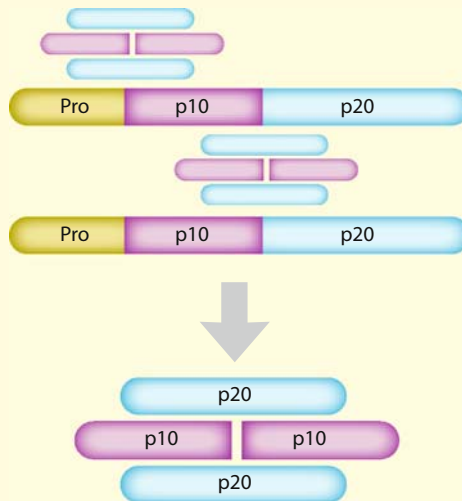
Beim Menschen gibt es mehr als ein Dutzend verschiedene Caspasen, die jeweils ihre eigenen spezifischen Ziele haben. Teilweise werden sie durch Spaltung der Zielproteine inaktiviert. In einigen Fällen wird durch die Spaltung ein Teil des Proteins freigesetzt, der eine neue Funktion erfüllt. In anderen Fällen spalten die Caspasen eine inhibitorische Domäne von einem inaktiven Protein ab und setzen dadurch die aktive Form frei.

A Aktive Caspasen sind Heterotetramere

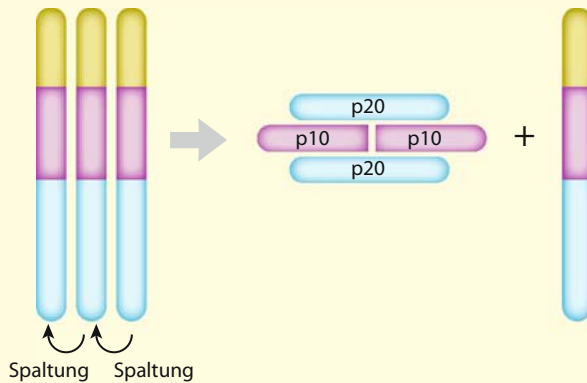
Caspasen liegen normalerweise als inaktive Monomere mit drei Domänen vor: der Prodomäne, welche die Aktivität inhibiert, der p10-Domäne und der p20-Domäne mit dem aktiven Zentrum. Nach Entfernen der Prodomäne lagern sich zwei p10- und zwei p20-Domänen zu einem Heterotetramer zusammen.



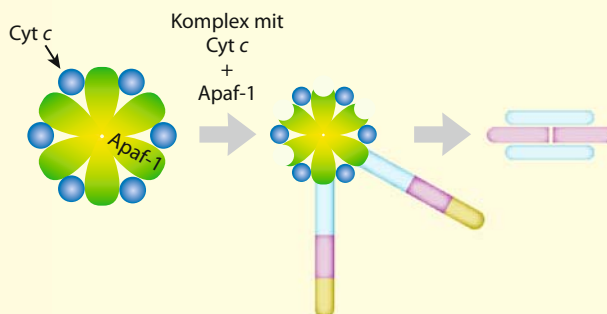
a Spaltung einer inaktiven Caspase durch eine zuvor aktivierte Caspase



b Spaltung einer inaktiven Caspase durch Selbstassoziation



c Spaltung einer inaktiven Caspase durch Assoziation mit einer regulatorischen Untereinheit

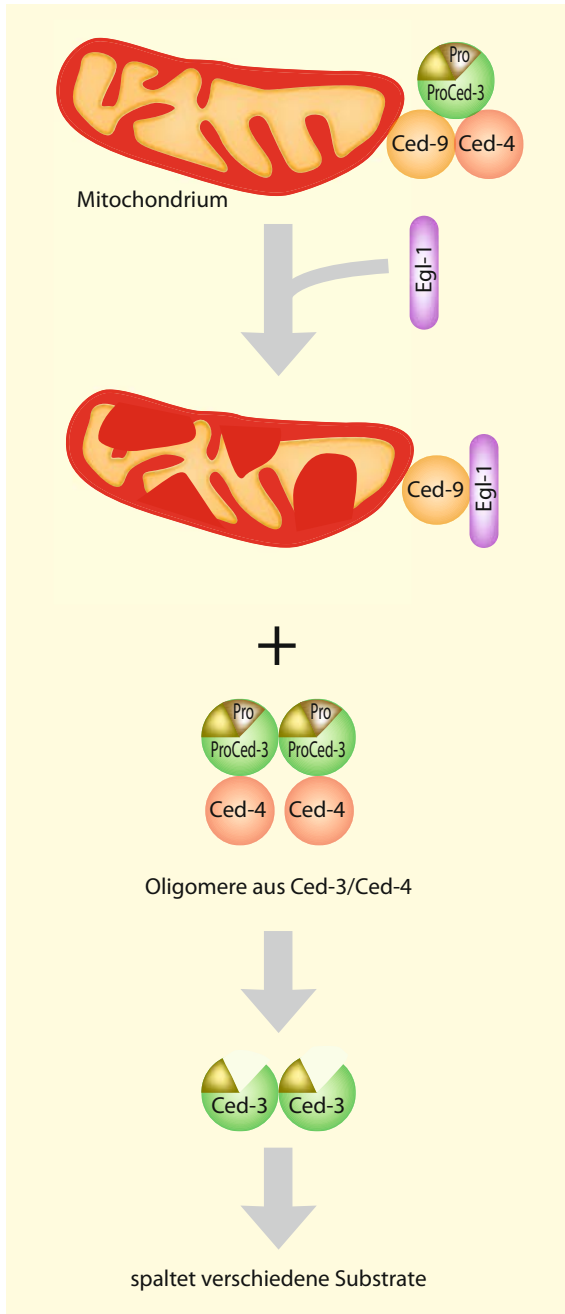


B Drei Methoden zur Aktivierung einer Caspase

a Inaktive Caspasemonomere können durch zuvor aktivierte Caspasen gespalten werden.

b Die Assoziation von drei inaktiven Caspasemonomeren kann bewirken, dass eines der Enzyme seine Nachbarn spaltet, wodurch zwei aktive p10- und p20-Domänen entstehen.

c Andere Enzyme als Caspasen können ebenfalls die Prodomäne von inaktiven Caspasemonomeren abspalten.



20.11 Programmierter Zelltod bei *C. elegans*

In der Membran der Mitochondrien von *C. elegans* befindet sich ein inaktiver Komplex aus CED-9, ProCED-3 und Dimeren von CED-4. Nach Auslösen der Apoptose bindet das Protein EGL-1 an CED-9 und setzt CED-4 und ProCED-3 frei. Daraufhin bilden sich Tetramere von CED-4 und spalten die inhibitorische Domäne von ProCED-3 ab. Das aktivierte CED-3 ist das zentrale Enzym: Es aktiviert die übrigen Caspasen und sorgt für die Durchführung des Apoptoseprogramms.

C. elegans bildet im Laufe seiner Entwicklung mehr Zellen, als schließlich beim adulten Fadenwurm vorhanden sind. Diese überzähligen Zellen sterben durch Apoptose ab.

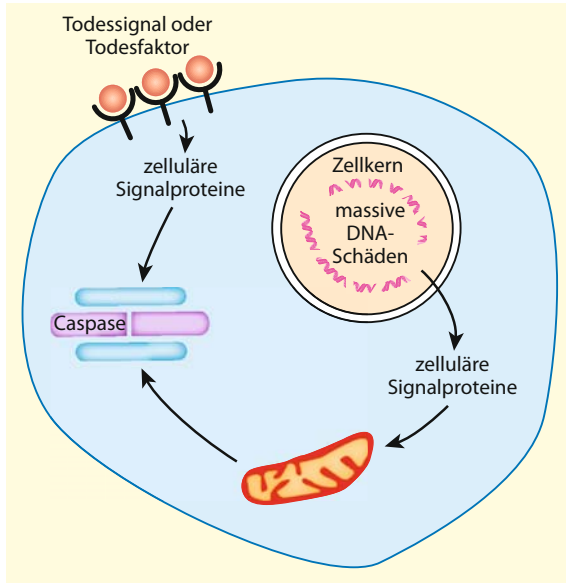
Die CED- und EGL-Proteine von *C. elegans* sind Bestandteile einer Kaskade, die den Zelltod auslöst. Bei CED-3 und CED-4 handelt es sich um spezielle, als Caspasen bezeichnete Proteasen, die bei der Apoptose als entscheidende Regulatoren fungieren.

Apoptose bei Säugetieren

Durch einen Vergleich der Genomsequenz von *C. elegans* mit der von Maus und Mensch konnte man bei Säugetieren zahlreiche homologe Gene zu den Apoptosegenen des Fadenwurmes entdecken. Da Apoptose beim Menschen während der gesamten Entwicklung und im Erwachsenenalter vorkommt, sind hier sehr viel mehr Proteine und Regulatoren mit der Apoptose assoziiert als bei Nematoden. Es gibt mehr als 15 Caspasen mit unterschiedlicher Gewebespezifität und Funktion. Weiterhin besitzen Säugetiere mehr als 20 Proteine, die CED-9 ähneln. Welche Rolle genau die an der Apoptose bei Säugetieren beteiligten Proteine spielen, muss erst noch erforscht werden.

In Säugetierzellen kann eine Apoptose auf zwei Wegen ausgelöst werden (Abb. 20.12). Bei den Caspasen laufen diese Wege schließlich zusammen. Einer dieser Wege trägt die Bezeichnung **Todesrezeptorweg** (engl. *death receptor pathway*), denn das Todessignal entsteht an einem Rezeptorprotein an der Zelloberfläche, dem **Todesrezeptor**. An die extrazelluläre Domäne dieses Rezeptors bindet ein externes Signalmolekül. Der Rezeptor überträgt das Signal an seine intrazelluläre Domäne und rekrutiert dann verschiedene interne Proteine zur Membran. Dadurch werden letztendlich die Caspasen aktiviert. Der andere Weg ist der **mitochondriale Weg** (engl. *mitochondrial death pathway*). Dieser wird gewöhnlich durch eine intrazelluläre Katastrophe ausgelöst, etwa durch irreparable DNA-Schäden. Diese aktivieren Proteine in den Mitochondrien, die verschiedene Effektormoleküle zur Aktivierung der Caspasen freisetzen.

Der Todesrezeptorweg kann unabhängig vom mitochondrialen Weg funktionieren, häufig werden jedoch beide Wege gleichzeitig aktiviert. An den Todesrezeptor binden recht vielfältige Signalmoleküle, deren biologische Bedeutung in den meisten Fällen

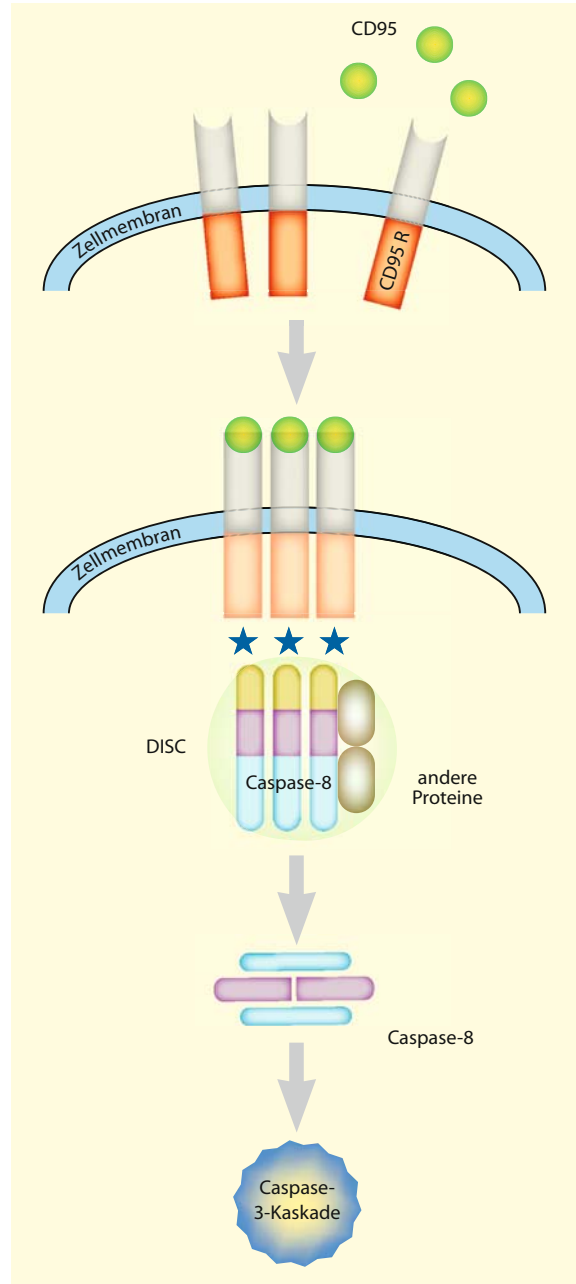


20.12 Aktivierung der Apoptose

Bei Säugetieren kann die Apoptose auf zwei verschiedenen Wegen aktiviert werden. Ein externes Todessignal (oder Todesfaktor) kann an einen Zelloberflächenrezeptor binden und ein intrazelluläres Signal zur Aktivierung der Caspasen auslösen. Interne Signale wie massive DNA-Schäden können in den Mitochondrien ebenfalls eine Signalkaskade auslösen, welche die Caspasen aktiviert.

noch nicht bekannt ist. Am besten verstanden ist CD95, auch als Fas-Ligand bezeichnet (Abb. 20.13). Hierbei handelt es sich um ein umfangreich glykosyliertes Zelloberflächenprotein von Immunzellen. Die Bindung von CD95 an seinen Rezeptor auf der Zielzelle (den CD95-Rezeptor, CD95R) bewirkt eine Trimerisierung des Rezeptors. Die intrazelluläre Domäne jedes Rezeptors wird durch die Nähe zu den anderen aktiviert. Der aktivierte CD95R rekrutiert einen Proteinkomplex mit der Bezeichnung DISC (für engl. *death-inducing signaling complex* – „todinduzierender Signalkomplex“) zur Zellmembran. Eine der Komponenten des DISC ist Caspase-8, die ihre eigene Prodomäne abspaltet und dabei die aktive Form freisetzt (s. Exkurs 20.2). Das Hauptziel für Caspase-8 ist Caspase-3, die direkt homolog zu CED-3 bei *C. elegans* ist. Ist Caspase-3 in Säugetierzellen erst einmal aktiviert, gibt es kein Zurück mehr: Die Zelle stirbt durch Apoptose ab.

Der mitochondriale Weg wird im Allgemeinen durch interne Reize wie irreparable Zellschäden aktiviert. Die Signale laufen bei einer Familie mitochondrialer Proteine zusammen, die nach ihrem

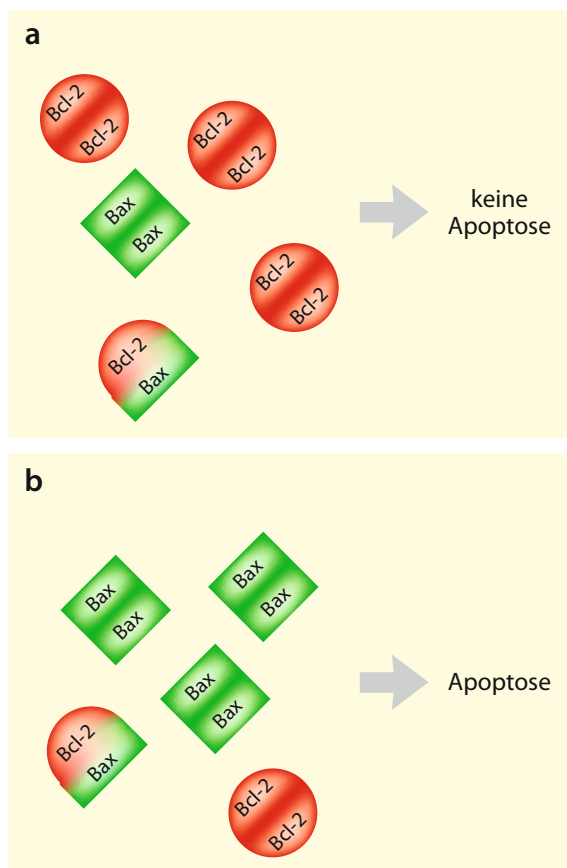


20.13 Der Todesrezeptorweg

Ein externes Signalmolekül namens CD95 kann den Zelltod auslösen. Wenn drei Moleküle CD95 an den CD95-Rezeptor binden, bilden die drei Rezeptoren gemeinsam einen Komplex, der die intrazellulären Domänen aktiviert. Dann bindet der DISC-Komplex an den Rezeptor. Die entscheidende Komponente von DISC ist Caspase-8. Bei Assoziation von drei Molekülen Caspase-8 werden die Prodomänen abgespalten, und die verbleibenden Domänen bilden ein Heterotetramer. Dieses aktiviert Caspase-3, die wiederum die Aktivierung weiterer Caspasen bewirkt.

Gründungsmitglied **Bcl-2** benannt ist; dieses wurde erstmals bei einem B-Zell-Lymphom identifiziert. Bcl-2 ist homolog zum CED-9-Protein von *C. elegans*. Anders als *C. elegans*, der nur ein einzelnes Protein dieser Klasse aufweist, besitzen Säugetiere eine Familie aus vielen Proteinen. Einige davon induzieren die Apoptose, andere hingegen schützen die Zellen vor Apoptose. Die Vertreter der Bcl-2-Familie sind als Dimere aktiv. Die relative Zahl jedes Proteins im dimerisierten Zustand steuert den mitochondrialen Weg (Abb. 20.14). Liegen mehr Dimere von Bcl-2 vor, was der Apoptose entgegenwirkt, dann stirbt die Zelle nicht ab. Sind jedoch mehr Dimere von Bax vorhanden, einem Mitglied der Proteinfamilie, das die Apoptose fördert, kommt es zum Absterben der Zelle.

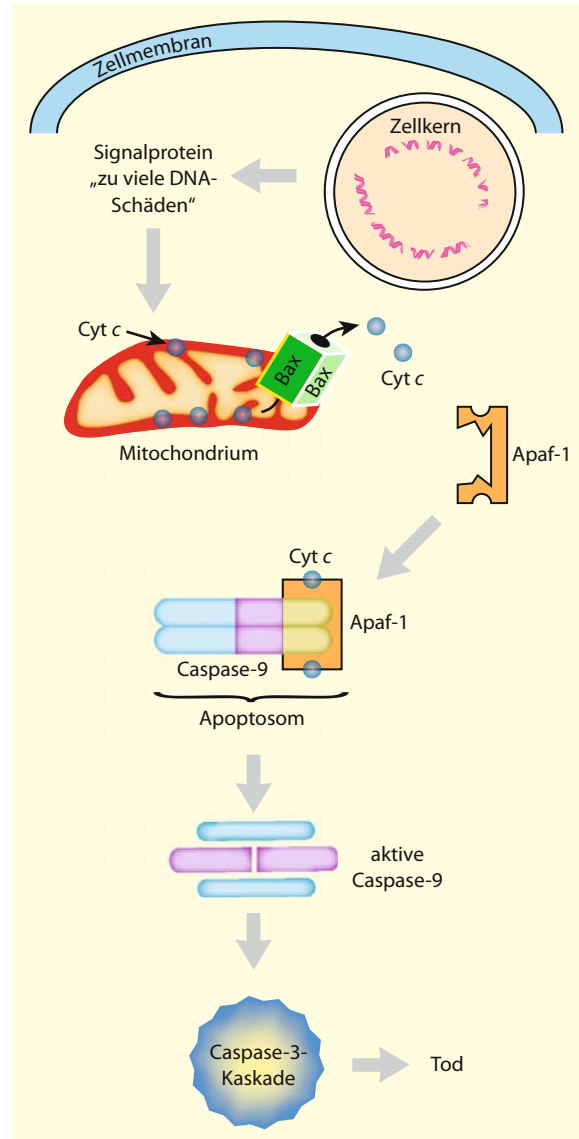
Bei Eintreffen eines Pro-Apoptose-Signals, ermöglicht ein Apoptose-aktivierendes Mitglied der Bcl/Bax-Familie das Austreten von **Cytochrom c** (Cyt c)



20.14 Bax/Bcl-2-Kontrolle der Apoptose

Das Verhältnis der Dimere, welche die Apoptose aktivieren (Bax) beziehungsweise vor Apoptose schützen (Bcl-2), kontrolliert, ob die Zellen durch Apoptose absterben.

aus den Mitochondrien durch Poren in der äußeren Membran (Abb. 20.15). Nach der Freisetzung induziert Cyt c die Bildung des **Apoptosoms**, das ist ein Signalkomplex aus Cyt c, Caspase-9 und Apaf-1.



20.15 Der mitochondriale Weg der Apoptose

Schwere Schäden an der DNA bilden das Signal für eine Zunahme von Bax/Bax-Dimeren. Diese formen einen Kanal, durch den Cytochrom c aus den Mitochondrien austreten kann. Cytochrom c bindet an Apaf-1 und induziert eine Konformationsänderung. Aktiviertes Apaf-1 lagert sich zu einem Heptamer zusammen, das an Pro-Caspase-9 bindet und deren Prodomäne abspaltet. Aktivierte Caspase-9 aktiviert Caspase-3, und die übrigen Caspasen vollstrecken das Todesurteil.

Apaf-1 ist das homologe Säugetierprotein zu CED-4 von *C. elegans*, und Caspase-9 entspricht CED-3. Während jedoch CED-4 durch CED-9 blockiert wird, weist Apaf-1 eine autoinhibitorische Domäne auf, die Teil des Apaf-1-Proteins selbst ist. Zudem bildet CED-4 bei Aktivierung ein Tetramer, Apaf-1 dagegen ein Heptamer (Abb. 20.15). Das Apaf-1-Heptamer im Apoptosom aktiviert Caspase-9 und diese wiederum – wie im Todesrezeptorweg – Caspase-3.

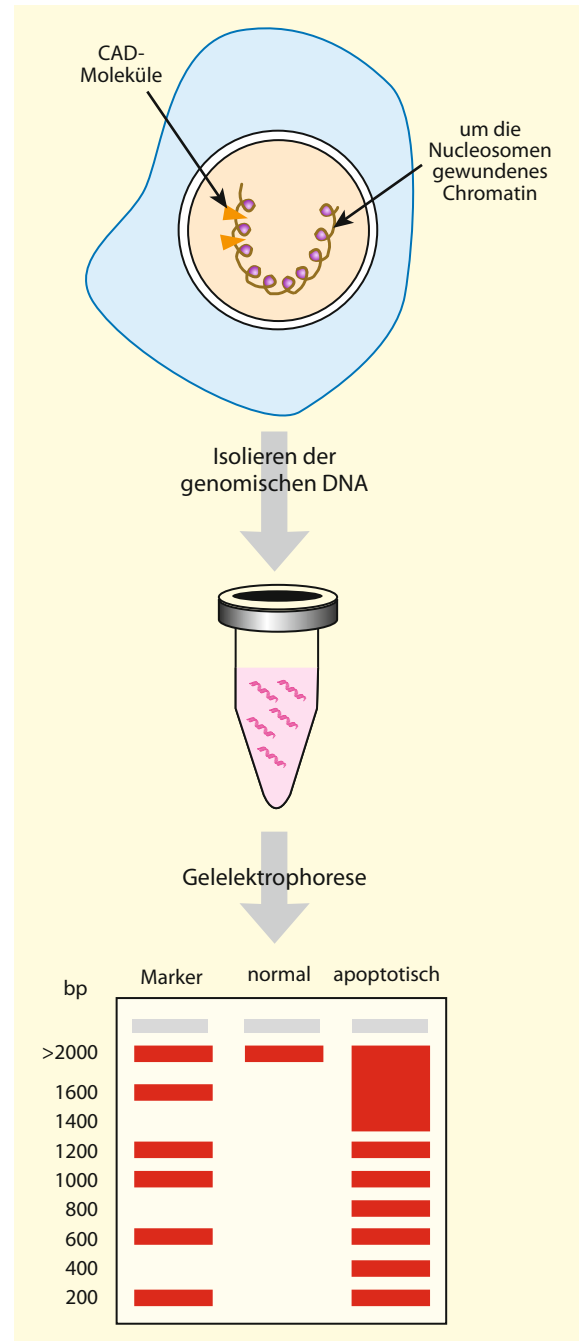
Die Apoptose wird über zwei verschiedene Wege aktiviert, über den Todesrezeptorweg und den mitochondrialen Weg.

Beim Todesrezeptorweg bindet CD95 (Fas-Ligand) an seinen Rezeptor CD95R, der sich mit zwei weiteren aktivierten CD95Rs zusammenlagert. Die intrazellulären Domänen aktivieren den DISC-Komplex, der wiederum Caspase-3 aktiviert. Das Verhältnis von Dimeren, welche die Apoptose aktivieren (Bax), und solchen, die vor Apoptose schützen (Bcl-2) kontrolliert, ob Zellen über den mitochondrialen Weg absterben. Das Pro-Apoptose-Signal löst die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien aus. Cytochrom c bindet an Apaf-1 und Caspase-9 und bildet das Apoptosom.

Exekutionsphase der Apoptose

Durch Aktivierung von CED-3 bei *C. elegans* und Caspase-3 beim Menschen wird die Zelle zur Apoptose verurteilt. Diese wird über eine Caspasekaskade ausgeführt. Eines der bekanntesten Ziele bildet **CAD** – für **Caspase-aktivierte DNase** –, eine Nuclease, die Kern-DNA zwischen den Nucleosomen spaltet (Abb. 20.16). Die DNA-Fragmente sind etwa 180 Basenpaare lang – das entspricht der Länge der um ein Nucleosom gewundenen DNA. Wenn Wissenschaftler feststellen möchten, ob sich eine Zelle im Prozess der Apoptose befindet, isolieren sie die genomische DNA und analysieren die Größe der Fragmente. Liegt die DNA in Mehrfachen von ungefähr 200 Basenpaaren Länge vor, so kann man daraus schließen, dass sich die Zelle in der Apoptose befand.

Caspasen haben noch zahlreiche andere Substrate. Proteine, welche die Kernstruktur aufrechterhalten, werden gespalten, sodass der Kern schrumpft und in kleine Fragmente zerfällt. Das Cytoskelett wird gespalten, und die Zellarchitektur löst sich auf und



20.16 CAD spaltet Kern-DNA während der Apoptose

Eines der Ziele von Caspasen ist CAD, die das Chromatin des Zellkerns verdaut. Da um jedes Nucleosom ungefähr 200 Basenpaare gewunden sind und CAD nur zwischen diesen Partikeln spaltet, liegt die DNA einer apoptotischen Zelle in Mehrfachen von 200 Basenpaaren Länge vor. Isoliert man genomische DNA aus einer Zelle in der Apoptose und führt eine Agarosegelelektrophorese durch, so bildet die DNA eine Leiter.

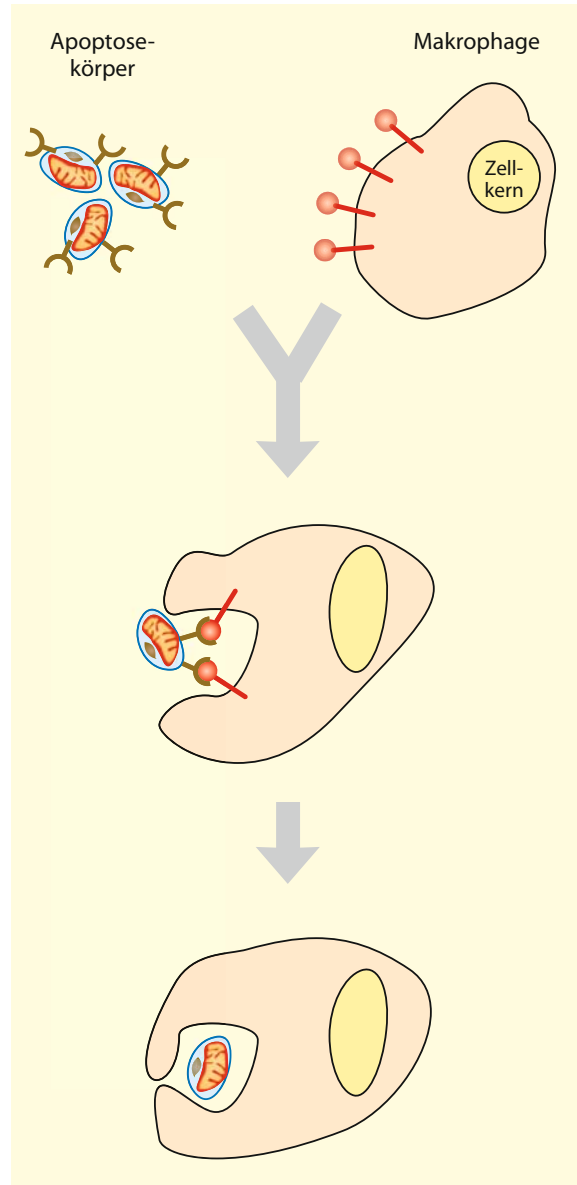
verdichtet sich. Andere Organellen werden verdaut und verlieren ebenfalls ihre Struktur. Zurück bleiben kleine kompakte Granula aus zellulärem Material, die sogenannten Apoptosekörper.

Während der Exekutionsphase spalten Caspasen Zellbestandteile wie Chromatin, die Kernarchitektur, das Cytoskelett und Organellen.

„Leichenbeseitigung“ bei der Apoptose

Die Apoptosekörper werden durch Phagocytose beseitigt. Bei *C. elegans* nehmen benachbarte Zellen die Apoptosekörper auf, bei Säugetieren ist die Situation komplexer. In einigen wenigen Bereichen des Körpers nehmen ebenfalls benachbarte Zellen die Apoptosekörper auf. In den meisten Fällen werden sie jedoch von Makrophagen inkorporiert (Abb. 20.17). Makrophagen sind Zellen des Immunsystems, deren primäre Aufgabe darin besteht, sämtliche Fremdkörper wie eindringende Bakterien zu beseitigen. Normalerweise rekrutieren Makrophagen andere Immunzellen an die Infektionsstelle. Bei der Beseitigung von Apoptosekörpern rekrutieren sie allerdings keine anderen Immunzellen – sie können diese also von fremden Eindringlingen unterscheiden.

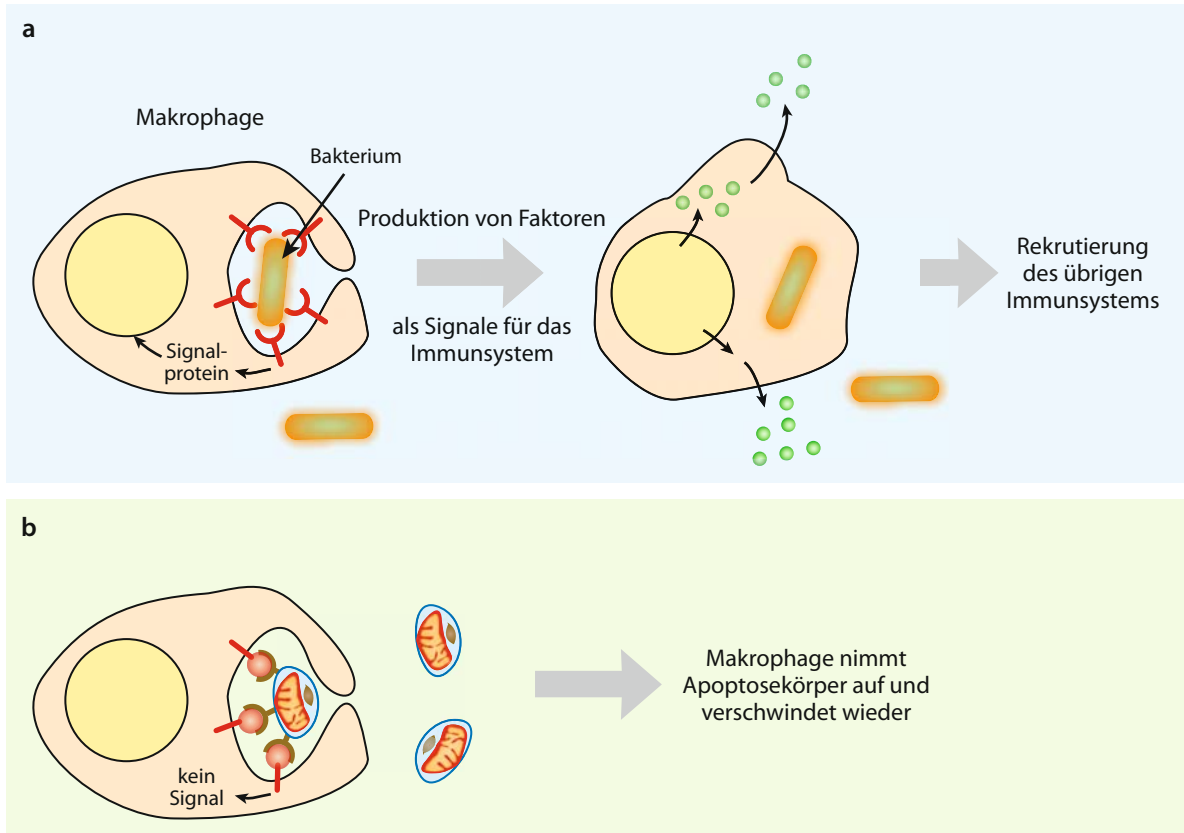
Wie wissen die Makrophagen, dass für die Apoptosekörper keine Immunantwort erforderlich ist? Bei der Aufnahme von Bakterien sezernieren die Makrophagen normalerweise lösliche Proteine und rekrutieren dadurch andere Immunzellen. Offenbar haben die Apoptosekörper auf ihrer Oberfläche Moleküle, welche die Makrophagen zwar veranlassen sie aufzunehmen, allerdings ohne dabei Immunsignalfaktoren freizusetzen. Die Zahl und Mechanismen dieser „Nimm mich auf“-Rezeptoren sind recht komplex, denn in verschiedenen Geweben von Säugetieren werden die Makrophagen durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert. Bei einem dieser Moleküle handelt es sich offensichtlich um Phosphatidylserin, ein Phospholipid, das normalerweise nur auf der Innenseite der Zellmembran zu finden ist (Abb. 20.18). Während der Apoptose kann Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran verlagert werden. Makrophagen haben Rezeptoren für Phosphatidylserin und können dadurch die Apoptosekörper als „eigen“ erkennen.



20.17 Beseitigung von Apoptosekörpern

Bei Säugetieren werden die meisten Apoptosekörper von Makrophagen beseitigt. Diese erkennen Zelloberflächenrezeptoren auf den Apoptosekörpern und nehmen ganze Zellfragmente durch Phagocytose auf. Sämtliche noch vorhandenen Proteine werden von den Makrophagen abgebaut und wiederverwertet.

Makrophagen verdauen Apoptosekörper und führen die zellulären Proteine der Wiederverwertung zu, ohne weitere Immunzellen zu rekrutieren



20.18 Apoptosekörper lösen keine Immunantwort bei den Makrophagen aus

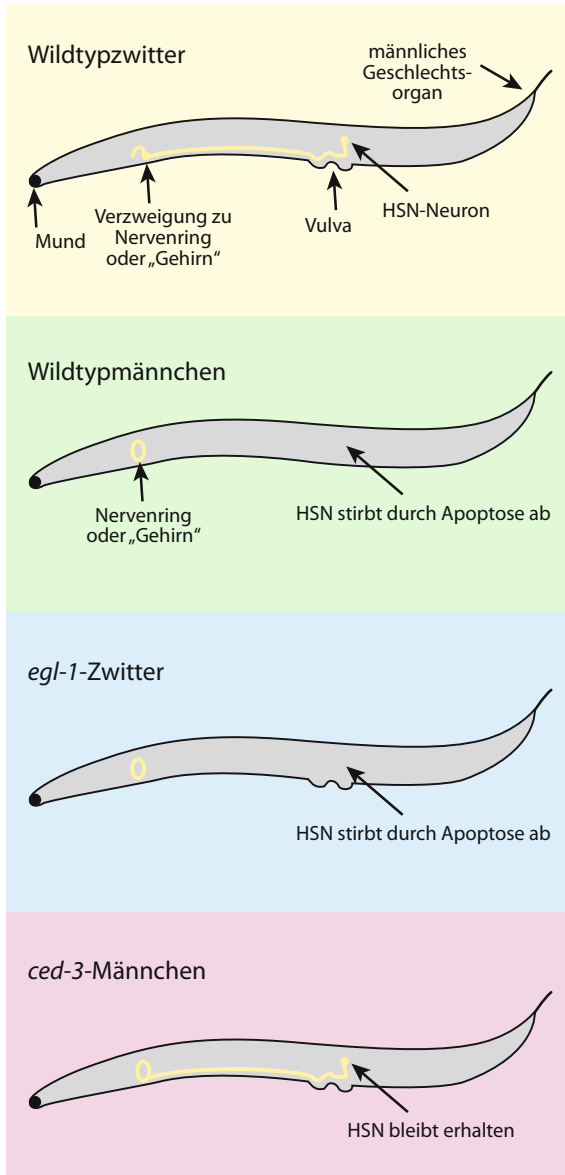
a Normalerweise nehmen Makrophagen eindringende Pathogene wie Bakterien auf. Diese Phagozytose löst bei den Makrophagen die Freisetzung von Faktoren aus, die andere Immunzellen anziehen. **b** Im Gegensatz dazu veranlasst das Zelloberflächensignal auf den Apoptosekörpern die Makrophagen nicht dazu, diese Faktoren freizusetzen, sodass keine anderen Immunzellen an diese Stelle rekrutiert werden.

Kontrolle der Apoptosewege während der Entwicklung

Der Beginn der Apoptose untersteht einer sehr komplexen Kontrolle; geht diese verloren, kann das fatale Auswirkungen haben. Bei einer zu umfangreichen Apoptose oder einer unangebrachten Aktivierung der Apoptose können voll funktionsfähige Zellen zerstört werden. Stirbt zu viel Gewebe ab, kann dies das Todesurteil für einen sich entwickelnden Organismus sein. Erfolgt nicht genügend Apoptose, insbesondere während der Entwicklung, so kann sich überschüssiges Gewebe bilden und die normale Funktion von Geweben und Organismen beeinträchtigen. Durch unzureichende oder feh-

lerhafte Apoptose können zahlreiche Krankheiten entstehen.

Bei *C. elegans* beruht die Entwicklung der Geschlechter auf Apoptose. Man kann bei *C. elegans* zwei „Geschlechter“ unterscheiden: männliche Tiere, die ausschließlich Spermien produzieren, und Zwitter, die sowohl Spermien als auch Eizellen bilden. Echte Weibchen gibt es nicht. Ob ein Tier zum Männchen oder zum Zwitter wird, hängt von der Apoptose ab (Abb. 20.19). Zwei Neuronen kontrollieren die Muskeln um die Vulva und ermöglichen die Eiablage. Bei Vorhandensein dieser Neuronen ist der Fadenwurm zwittrig. Ohne diese Muskeln können die Fadenwürmer keine Eier legen, was sie praktisch zu Männchen macht. Das Vorhandensein oder Fehlen dieser zwitterspezifischen Neuronen (HSN,



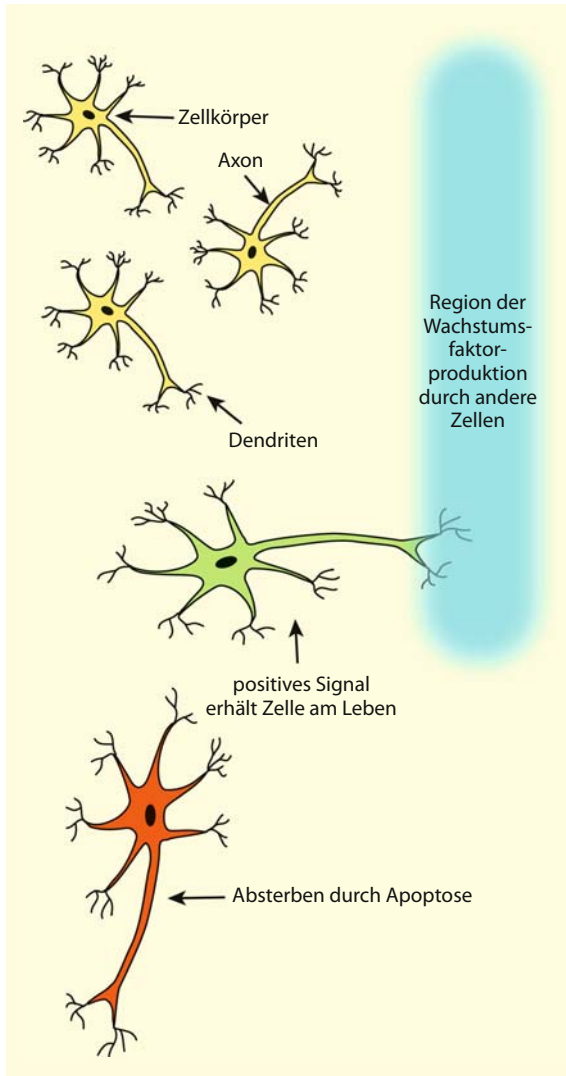
20.19 Bei *C. elegans* wird die Geschlechtsbestimmung durch Apoptose gesteuert

Bei dem Fadenwurm *C. elegans* gibt es zwei Geschlechter: Männchen, die Spermien produzieren, und Zwitter, die sowohl Spermien als auch Eizellen bilden. Eine bestimmte Nervenzelle mit der Bezeichnung HSN legt fest, ob ein Individuum Eier ablegt oder nicht. Ob HSN vorhanden ist oder nicht, hängt von der Apoptose während der Entwicklung ab. Mutationen des Gens *egl-1* induzieren eine zu umfangreiche Apoptose; deshalb sterben die HSN-Neuronen während der Entwicklung ab, und *egl-1*-Zwitter können keine Eier legen. Im Gegensatz dazu verhindern *ced-3*-Mutationen die Apoptose, weshalb die HSN-Neuronen stets vorhanden sind. Selbst *ced-3*-Männchen können daher Eier legen.

für engl. *hermaphrodite-specific neurons*) ist abhängig von der Apoptose. Defekte der Gene *ced-3* oder *egl-1* legen fest, ob sich ein Wurm zum Männchen oder zum Zwitter entwickelt. Ohne *egl-1* erfolgt die Apoptose in zu großem Umfang; daher fehlt sämtlichen Fadenwürmern das HSN, und es werden keine eierlegenden Individuen produziert. Umgekehrt kann ohne *ced-3* keine Apoptose erfolgen, und die HSN bleiben bei allen Individuen erhalten.

Bei einer Immunantwort unterliegt die Apoptose einer strengen Regulation. Im Zuge einer Infektion reagiert der Körper auf den Angriff durch eine erhöhte Zahl weißer Blutzellen des Immunsystems. Nach Abklingen der Infektion beseitigt der Körper die überschüssigen Immunzellen durch Apoptose. Immunzellen lösen die Apoptose über den Todesrezeptorweg aus (s. weiter vorne). Bei zu umfangreicher Apoptose würde unser Immunsystem wichtige Zellen verlieren und die Immunantwort beeinträchtigen. Bei einer HIV-Infektion sinkt die Zahl der T-Zellen auf ein gefährlich niedriges Niveau ab, wodurch der Patient anfällig für viele Sekundärinfektionen wird (s. Kap. 22). Einer Hypothese zufolge tötet HIV die T-Zellen ab, indem es die Apoptose auslöst.

Das Nervensystem ist ebenfalls ein gegenüber Apoptose sehr anfälliges Gewebe. Während der Entwicklung machen zahlreiche Neuronen eine Apoptose durch. Es wurde postuliert, dass Nervenzellen absterben, wenn sie nicht ein „lebenserhaltendes“ Signal, einen **neurotrophen Faktor**, erhalten. Erreicht ein sich entwickelndes Neuron sein korrektes Ziel, erhält es den neurotrophen Faktor. Kommt es jedoch nicht an sein Ziel, erhält es auch keinen neurotrophen Faktor und geht standardmäßig in die Apoptose über. In einer Zellkultur von Nervenzellen kann man durch Entzug eines neurotrophen Faktors, des Nervenwachstumsfaktors NGF (engl. **nerve growth factor**), eine Apoptose auslösen (Abb. 20.20). Durch Zugabe von Caspaseinhibitoren lässt sich der Zelltod verhindern – ein Beweis dafür, dass die Zellen durch Apoptose absterben. Bei der Entwicklung von Mäusen sterben Embryonen mit defekten Genen für Caspase-3 oder Caspase-9 ab. Eine nicht erfolgende Apoptose während der Entwicklung des Nervensystems bildet in beiden Fällen die Haupttodesursache. Im erwachsenen Gehirn führt die Apoptose von Neuronen zu irreparablen Schäden, weil sich Neuronen nicht regenerieren. Bei vielen Krankheiten könnte eine übermäßige Apoptose eine Rolle spielen, etwa bei der Alzheimer-Krankheit (s. unten), der Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington und amyotropher Lateralsklerose (ALS). Die genaue Rolle, die



20.20 Wachstumsfaktoren halten Neuronen am Leben

Nervenzellen machen eine Apoptose durch, wenn ihre Dendriten keine neurotrophen Faktoren wie den Nervenwachstumsfaktor NGF erhalten.

Apoptose bei diesen Krankheiten spielt, muss jedoch erst noch erforscht werden.

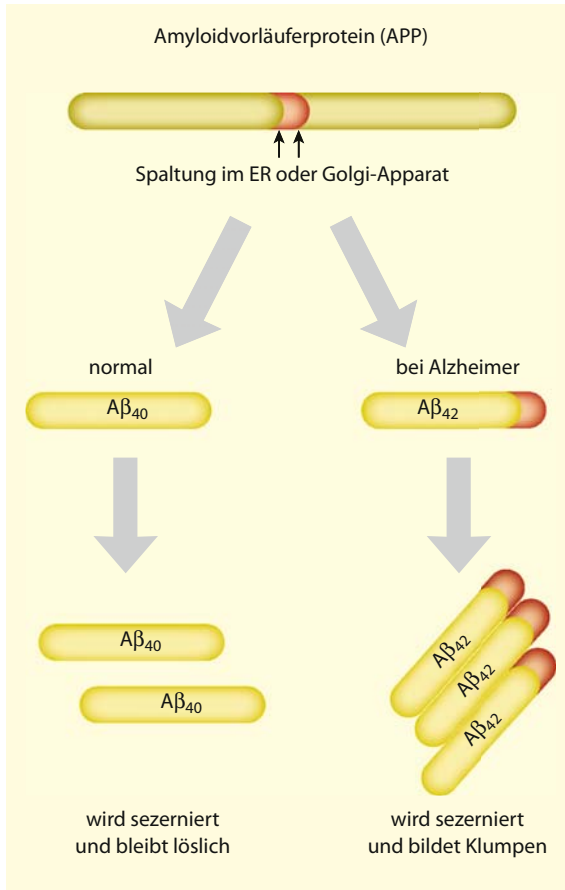
Das Vorhandensein oder Fehlen der HSN-Neuronen, die festlegen, ob ein Individuum von *C. elegans* sich zum Männchen oder zum Zwitter entwickelt, wird durch Apoptose gesteuert.

Wenn Neuronen kein Signal in Form eines neurotrophen Faktors erhalten, sterben sie durch Apoptose ab.

Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit ist durch zwei pathologische Merkmale im Gehirn gekennzeichnet: durch **senile (oder) neuritische Plaques** und durch **Neurofibrillenbündel**. Die senilen Plaques bilden sich, wenn degenerierende Neuronen zu großen Klumpen aggregieren. Diese Aggregate enthalten als **Amyloid β ($A\beta$)** bezeichnete Proteinfragmente, die von dem Amyloidvorläuferprotein APP (engl. *amyloid precursor protein*) stammen. Normalerweise wird das Vorläuferprotein im endoplasmatischen Reticulum von einem Enzym gespalten und bildet eine aus 40 Aminosäuren bestehende Form namens $A\beta_{40}$. Bei der Alzheimer-Krankheit wird das APP an der falschen Stelle gespalten, und es entsteht eine aberrante Form aus 42 Aminosäuren ($A\beta_{42}$) (Abb. 20.21). Diese Form neigt zur Aggregation in Klumpen. Neben diesen Ablagerungen bilden sich in den ansonsten normalen Neuronen auch noch Neurofibrillenbündel. Dazu kommt es, wenn das mit den Mikrotubuli assoziierte **Tau-Protein** beginnt, helikale Aggregate zu bilden. Die Bündel führen schließlich zum Absterben der Nervenzellen, denn diese sind darauf angewiesen, dass die Mikrotubuli (und Tau) Neurotransmitter vom Zellkörper zu den Dendriten transportieren.

Neben dem Tau- und dem Amyloid- β -Protein sind vermutlich noch weitere Proteine am Entstehen der Alzheimer-Krankheit beteiligt. **Präseniline** sind Transmembranproteine des endoplasmatischen Reticulums und des Golgi-Apparats. Durch Mutationen der Präseniline kann vermehrt die $A\beta_{42}$ -Form von Amyloid β sezerniert werden. Ob es sich bei den Präsenilinen tatsächlich um Proteasen handelt, die das APP spalten, muss noch bestätigt werden. Mutierte Präseniline machen die Nervenzelle zudem empfindlicher gegenüber der Apoptose; durch welchen Mechanismus dies erfolgt, ist allerdings noch nicht bekannt. Mutationen der Präsenilingene *presenilin-1* und *presenilin-2* gehören zu den häufigsten Defekten bei Patienten mit familiär auftretender Alzheimer-Krankheit. Bei diesen Mutationen setzt die Krankheit auch früher ein als gewöhnlich. Ein weiteres wahrscheinlich an Alzheimer beteiligtes Protein ist Apolipoprotein E. Ein bestimmtes Allel für dieses Protein ($\epsilon 4$) begünstigt die Bildung von Plaques. Bei Vererbung dieses Allels besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, im Alter von über 60 Jahren die Alzheimer-Krankheit zu bekommen.



20.21 Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins (APP)

Normalerweise wird das Protein APP (engl. *amyloid precursor protein*) während des Transports durch das endoplasmatische Reticulum (ER) in ein Protein aus 40 Aminosäuren gespalten. Bei Alzheimer-Patienten wird APP zu einer Form aus 42 Aminosäuren prozessiert, die zu großen Klumpen (Plaques) aggregiert.

Die Bildung seniler Plaques führt zum Absterben von Nervenzellen, und es kommt zum Funktionsverlust in den betroffenen Bereichen des Gehirns. Wenn sich ein solcher Plaque bildet, wird das Immunsystem durch lösliche Signale von Mikrogliazellen in der Umgebung alarmiert. Diese Zellen werden durch die Aggregation von Amyloid β aktiviert. Nach Aktivierung des Immunsystems töten die Immunzellen noch weitere Neuronen ab: durch die Sekretion von Proteinen, die den Todesrezeptorweg der Apoptose aktivieren. (Das Immunsystem spielt bei vielen neurodegenerativen Krankheiten eine wesentliche Rolle.)

Da die Funktion von Amyloid β bei der Plaquebildung zu den zentralen Aspekten der Alzheimer-Krankheit zählt, hat man sich bei der Suche nach einer Behandlungsmöglichkeit in jüngerer Zeit auf dieses Molekül konzentriert. Es ist Wissenschaftlern gelungen, einen Antikörper zu erzeugen, der bei Mäusen die Verklumpungen von Amyloid β auflöst. Diesen Antikörper kann man Alzheimer-Patienten als Impfstoff verabreichen. Wie erste klinische Versuche gezeigt haben, hat er nur wenige oder gar keine Nebenwirkungen. Obwohl der genaue Wirkmechanismus noch nicht geklärt ist, wird in klinischen Tests bereits untersucht, wie effektiv dieser Impfstoff bei menschlichen Alzheimer-Patienten ist. In fünf bis zehn Jahren wird man vielleicht eine echte Behandlungsmöglichkeit für diese verheerende Krankheit haben.

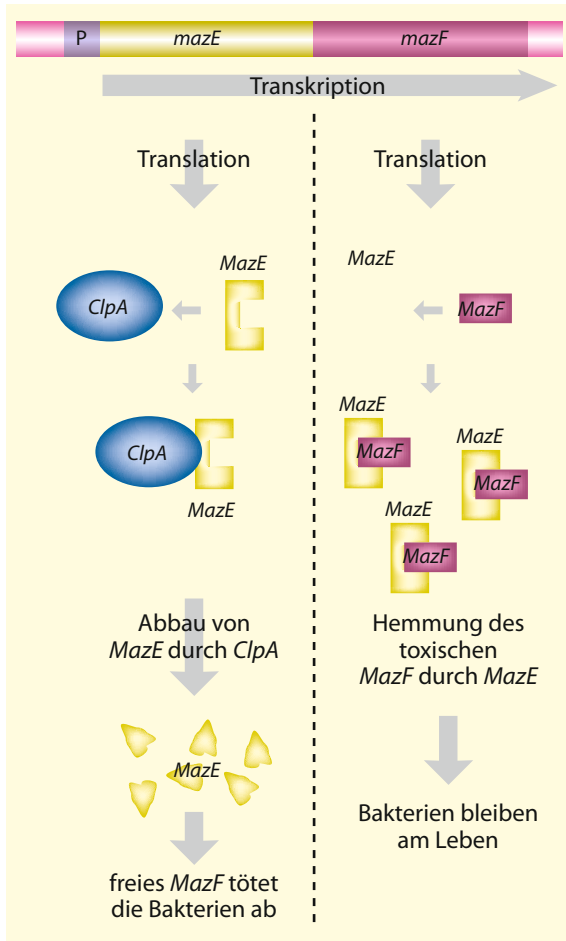
Für die Alzheimer-Krankheit gibt es zwei pathologische Kennzeichen im Gehirn: senile (oder) neuritische Plaques und Neurofibrillenbündel.

Zu den mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebrachten Proteinen zählen Amyloid β , Tau, Präsenilin und Apolipoprotein E.

Programmierter Zelltod bei Bakterien

Bei einzelligen Organismen hat man bisher noch keine Apoptose beobachtet, bei *Escherichia coli* existiert jedoch ein genetisches System, das die Bakterien unter extremen Stressbedingungen absterben lässt. Morphologisch weist dieser Tod keine Ähnlichkeiten zur Apoptose auf, aber wie die Apoptose ist auch dieser Absterbemechanismus genetisch codiert. Bei *E. coli* kontrolliert ein im Englischen als **addiction module** bezeichnetes Modul aus zwei Genen das System, welches das Absterben auslöst (Abb. 20.22). Eines der Gene codiert für das recht stabile Toxin MazF. Das zweite Gen codiert für das Antitoxin MazE, welches verhindert, dass das Toxin die Bakterien abtötet. Das Antitoxin ist instabil und zerfällt nach der Translation sehr rasch. Wird seine Transkription oder Translation auf irgendeine Weise gestoppt oder verlangsamt, sinkt die Antitoxinmenge drastisch ab, und die Bakterien werden durch das Toxin abgetötet.

Das MazF-Toxin baut als Endoribonuclease spezifisch mRNA ab. Es erkennt die Sequenz ACA und



20.22 Das MazEF-System von *E. coli*

Die beiden Gene *mazE* und *mazF* kontrollieren, ob *E. coli* Selbstmord begeht oder nicht. Das MazF-Protein wirkt als Toxin und tötet die Bakterien ab. Es zeichnet sich durch eine hohe Stabilität aus und wird kontinuierlich produziert. Das MazE-Antitoxin schützt *E. coli*, indem es das MazF-Toxin inhibiert. MazE wird jedoch sehr rasch von der ClpA-Protease abgebaut. Unter Normalbedingungen stellt *E. coli* kontinuierlich das Antitoxin her. Sind die Bakterien allerdings Stress ausgesetzt, stellen sie unter Umständen die Proteinsynthese ein. Dann wird das Antitoxin nicht mehr synthetisiert, und das Toxin kann ungehindert sein Suizidprogramm aktivieren.

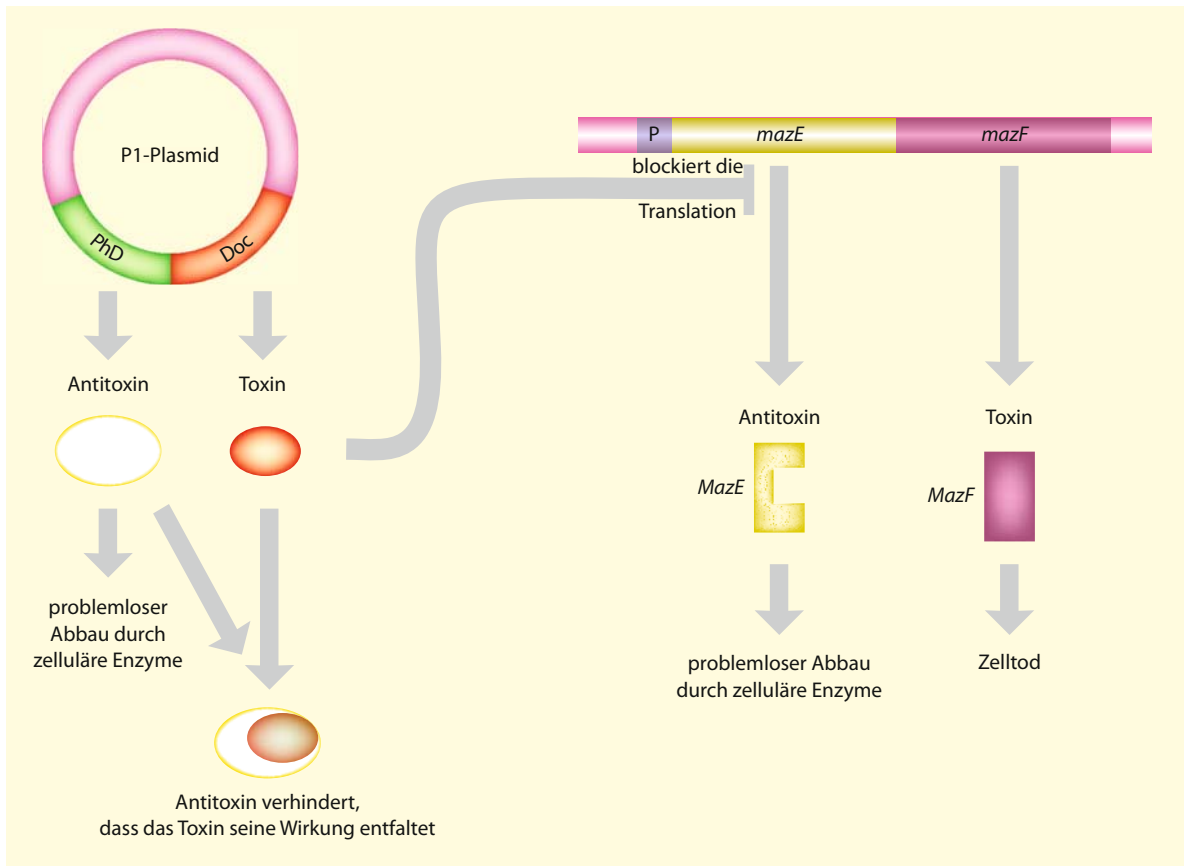
spaltet an deren 5'-Seite. Solche Enzyme bezeichnet man als mRNA-Interferasen. Mittlerweile hat man sie bei verschiedenen Bakterien nachweisen können. Sie führen letztendlich zum Abbau der mRNA, worauf die Proteinsynthese zum Stoppen kommt. Die Folge ist ein rascher Zelltod.

Wenn durch Nährstoffmangel die Transkription und Translation von Bakterien verlangsamt werden, kann dies der Auslöser für das MazEF-Suizidssystem sein. Möglicherweise begehen einige *E. coli* zugunsten der übrigen Selbstmord, weil die Proteine, Lipide und Nucleinsäuren der toten Zellen den benachbarten Zellen Nährstoffe liefern können. Obwohl es sich bei Bakterien um einzellige Organismen handelt, verfügen sie über ein genetisches Programm zum Wohl der gesamten Population. Einer anderen Hypothese zufolge könnte das MazEF-Suizidssystem dazu dienen, die Vermehrung von Bakterienviren einzuschränken. Tatsächlich ist bei *E. coli*-Mutanten mit einer Deletion des gesamten *mazEF*-Operons eine stärkere Vermehrung von Bakteriophagen festzustellen, wenn sie platzen. Bei Wildtypzellen tötet das MazEF-System die Zelle ab, bevor die Replikation der Viren abgeschlossen ist, und verringert so die Zahl der produzierten Viren.

Ähnliche Genmodule (*addiction modules*) existieren auch bei Bakteriophagen wie P1 und Lambda; sie halten diese in einem lysogenen Zustand. Das Proteinpaar Toxin/Antitoxin verhindert, dass das Bakteriophagen Genom während der Vermehrung von *E. coli* zerstört wird oder verloren geht. Das Bakteriophagen Genom codiert sowohl für das Toxin als auch für das Antitoxin. Wie beim MazEF-System zeichnet sich auch hier das Toxinprotein durch eine hohe Stabilität aus, während das Antitoxin rasch abgebaut wird und kontinuierlich produziert werden muss. Geht das P1- oder Lambda-Genom verloren, werden die Bakterien durch das stabile Toxin abgetötet. Interessanterweise wirkt das von P1 produzierte Toxin nicht direkt tödlich auf *E. coli*, sondern aktiviert das eigene MazEF-System der Bakterien (Abb. 20.23). Das P1-Toxin inhibiert die Translation des MazE-Antitoxins; dadurch wird das MazF-Toxin aktiviert und bewirkt das Absterben der Zelle.

Bei *E. coli* existiert ein System für den programmierten Zelltod, das durch die beiden Proteine MazE und MazF kontrolliert wird. Das Antitoxin MazE muss kontinuierlich synthetisiert werden; ist kein MazE vorhanden, tötet das Toxin MazF die Zelle ab.

Das ähnliche, aus zwei Genen bestehende Phd/Doc-System des Bakteriophagen P1, kontrolliert, ob eine Wirtszelle am Leben bleibt oder abstirbt. Verliert die Zelle das P1-Genom, induziert das Doc-Toxin über MazE und MazF den Zelltod des Bakteriums.



20.23 Das PhD/Doc-System von P1

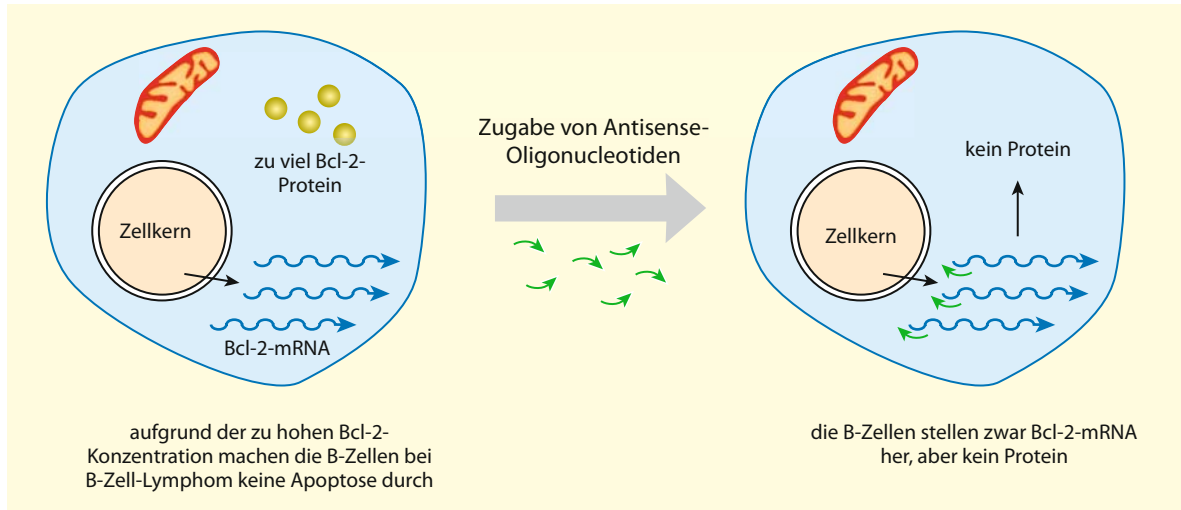
PhD/Doc ist ein Genmodul (*addiction module*) von P1, das für ein Proteinpaar aus Toxin und Antitoxin codiert. Das Antitoxin ist instabil und muss ständig synthetisiert werden, damit das Toxin nicht seine Wirkung entfaltet. Wird das PhD-Protein aus irgendeinem Grund nicht produziert, inhibiert Doc die Translation von MazE. Ohne MazE aktiviert das MazF-Toxin das Suizidprogramm.

Behandlung von Krebs durch Auslösen der Apoptose

Seit vielen Jahren schon versuchen Wissenschaftler, bei Krebszellen den Zelltod zu induzieren. In der Regel erfolgt dies durch Bestrahlung oder Chemotherapie. Nachteilig an den gegenwärtig angewendeten Therapien ist vor allem, dass sie unspezifisch wirken. Sie töten nicht nur Krebszellen ab, sondern auch andere Zellen. Jede Säugetierzelle enthält jedoch die genetische Information für eine Apoptose – selbst Krebszellen, auch wenn bei diesen die normale Kon-

trolle außer Kraft gesetzt wurde. In jüngster Zeit haben sich die Forschungen auf das gezielte Auslösen der Apoptose bei Krebszellen konzentriert.

Eine Möglichkeit besteht darin, den mitochondrialen Weg der Apoptose zu aktivieren. Vor Apoptose geschützt werden die Zellen durch eine große Menge Bcl-2. Durch eine Reduktion der Bcl-2-Konzentration in Krebszellen könnte man diese möglicherweise anfälliger für eine Apoptose machen. (Mäuse mit einer Deletion des *Bcl-2*-Gens sterben aufgrund von erhöhter Apoptose, insbesondere im Lymphgewebe, in dem die **B-Zellen** des Immunsystems reifen.) Verringern lässt sich die Synthese des Bcl-2-Proteins mithilfe einer einzelsträngigen **Antisense-DNA** aus 18 Nucleotiden. Ihre Sequenz ist komplementär zur



20.24 Antisense-Oligonucleotide blockieren die Apoptose bei Krebszellen

Das Anti-Apoptose-Protein Bcl-2 schützt die B-Zellen bei B-Zell-Lymphom vor der Apoptose. Man kann in die Krebszellen eine kurze Antisense-DNA mit einer zum *Bcl-2*-Gen komplementären Sequenz einführen. Die Antisense-DNA bindet an die Startregion der Translation und blockiert die Synthese des Bcl-2-Proteins. Dadurch sind die Krebszellen nun nicht mehr vor Apoptose geschützt.

Startregion der Translation des *Bcl-2*-Gens. Durch die Bindung des **Antisense-DNA-Oligonucleotids** an die Bcl-2-mRNA wird die Translation blockiert und weniger Protein hergestellt (Abb. 20.24). Bei einem an Patienten mit B-Zell-Lymphom durchgeführten klinischen Test zeigte sich bei sechs von 14 Patienten eine stark verringerte Bcl-2-Konzentration und eine verbesserte Antikrebsreaktion.

Zum *Bcl-2*-Gen komplementäre Antisense-DNA-Oligonucleotide inhibieren die Translation und reduzieren daher die Menge an Bcl-2 in Krebszellen. Ohne das anti-apoptotisch wirkende Bcl-2 erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die Krebszellen durch Apoptose absterben.

► Weiterführende Literatur

Anderton BH (1999) Alzheimer's disease: Clues from flies and worms. *Curr Biol* 9: R106–109

Campisi J (1996) Replicative senescence: An old lives' tale? *Cell* 84: 497–500

Finch CE, Ruvkun G (2001) The genetics of aging. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 435–462

Hazan R, Sat B, Reches M, Engelberg-Kulka H (2001) Postsegregational killing mediated by the P1 phage „addiction module“ phd-doc requires the *Escherichia coli* programmed cell death system mazEF. *J Bacteriol* 183: 2046–2050

Hekimi S, Lakowski B, Barnes TM, Ewbank JJ (1998) Molecular genetics of life span in *C. elegans*: How much does it teach us? *Trends Genet* 14: 14–20

Hodgkin J (1999) Sex, cell death, and the genome of *C. elegans*. *Cell* 98: 277–280

Itahana K, Dimri G, Campisi J (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 268: 2784–2791

Kenyon C (1996) Ponce d'elegans: Genetic quest for the fountain of youth. *Cell* 84: 501–504

Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789–795

Le Bourg E (2001) Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 498: 183–186

Leevers SJ (2001) Growth control: Invertebrate insulin surprises. *Curr Biol* 11: R209–212

Marciniak RA, Johnson FB, Guarente L (2000) Diskeratitis congenital, telomeres and human ageing. *Trends Genet* 16: 193–195

Meier P, Finch A, Evan G (2000) Apoptosis in development. *Nature* 407: 796–801

Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, Clayton PE, Wallace DC, Malfroy B, Doctrow SR, Lithgow GJ (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289: 1567–1569

- Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR (1998) Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: Past, present and future. *Trends Genet* 14: 410–416
- Miller RA (1996) The aging immune system: Primer and prospectus. *Science* 273: 70–74
- Nicholson DW (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407: 810–816
- Orrell RW, Habgood JJ, Gardiner I, King AW, Bowe FA, Hallewell RA, Marklund SL, Greenwood J, Lane RJ, deBelleroche J (1997) Clinical and functional investigation of 10 missense mutations and a novel frameshift insertion mutation of the gene for copper-zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 48: 746–751
- Parrish J, Metters H, Chen L, Xue D (2000) Demonstration of the *in vivo* interaction of key cell death regulators by structure-based design of second-site suppressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11916–11921
- Pawelec G, Hirokawa K, Fülöp T (2001) Altered T cell signaling in ageing. *Mech Ageing Dev* 122: 1613–1637
- Raloff J (2001) Coming to terms with death: Accurate descriptions of a cell's demise may offer clues to diseases and treatments. *Science News* 159: 378–380
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH (2000) Defying death after DNA damage. *Nature* 407: 777–783
- Sat B, Hazan R, Fisher T, Khaner H, Glaser G, Engelberg-Kulka H (2001) Programmed cell death in *Escherichia coli*: Some antibiotics can trigger mazEF lethality. *J Bacteriol* 183: 2041–2045
- Sat B, Reches M, Engelberg-Kulka H (2003) The *Escherichia coli* mazEF suicide module mediates thymineless death. *J Bacteriol* 185: 1803–1807
- Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784–788
- Serrano M, Blasco MA (2001) Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13: 748–753
- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: The key switch mechanism in insulin signaling. *Biochem J* 333: 471–490
- Sherr CJ, DePinho Ra (2000) Cellular senescence: Mitotic clock or culture shock. *Cell* 102: 407–410
- Smith JR, Pereira-Smith OM (1996) Replicative senescence: Implications for *in vivo* aging and tumor suppression. *Science* 273: 63–67
- Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59–63
- Takahashi Y, Kuro OM, Ishikawa F (2000) Aging mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12407–12408
- Wright WE, Shay JW (2000) Telomere dynamics in cancer progression and prevention: Fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med* 6: 849–851
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802–809

Bakterielle Infektionen

Einführung

Molekulare Methoden zur Diagnose

Virulenzgene finden sich häufig auf mobilen DNA-Abschnitten

Adhäsion und Eindringen pathogener Bakterien

Aufnahme von Eisen durch pathogene Bakterien

Bakterielle Toxine

ADP-ribosylierende Toxine

Choleratoxin

Milzbrandtoxin

Antitoxintherapie

Weiterführende Literatur

Einführung

Infektionen des Menschen sowie von Tieren und Pflanzen werden durch unterschiedlichste Mikroorganismen wie Viren, Bakterien oder einzellige Eukaryoten verursacht. Auch bei den Infektionsmechanismen gibt es eine beträchtliche Bandbreite: vom einfachen Vorgehen bestimmter filamentöser Pilze, die lediglich organisches Material überwachsen, bis hin zu äußerst komplizierten Systemen, mit deren Hilfe spezialisierte Pathogene wie etwa die Erreger von Beulenpest oder Malaria in ihre Wirte eindringen und überleben. Im Folgenden geht es nun darum, wie man durch Anwendung der modernen Molekularbiologie ein besseres Verständnis der Infektionen erlangen und diese bekämpfen kann.

Am besten verstanden sind die molekularen Mechanismen pathogener Bakterien, vor allem solcher, die eng mit *Escherichia coli* verwandt sind. Die meisten *E. coli*-Stämme sind harmlos, es existieren jedoch auch einige wenige virulente Stämme, die viele der Infektionsprinzipien auf molekularer Ebene veranschaulichen. Viren besitzen kleinere Genome als Bakterien. Sie sind als obligate intrazelluläre Parasiten auf viele Gene der Wirtszellen angewiesen, beispielsweise für ihre Replikation. Folglich interagieren Viren auf komplexe Weise mit dem Wirtszellgenom. Das macht Analysen häufig komplizierter als bei Bakterien (s. Kap. 22). Am schwierigsten zu verstehen sind Infektionen wie Malaria oder Schlafkrankheit, die von einzelligen Eukaryoten verursacht werden.

Mit modernen genetischen Analysemethoden kann man sämtliche Organismen erforschen – sei es der eindringende Mikroorganismus oder auch das Opfer der Infektion –, solange sie DNA oder RNA enthalten, die man extrahieren, sequenzieren und manipulieren kann. Die molekularen Methoden haben viel zu einem besseren Verständnis und einer verbesserten Diagnose von Infektionskrankheiten beigetragen. Inzwischen werden auch immer mehr neue Methoden entwickelt, die einen Schutz gegen bestimmte Krankheiten bieten.

Pathogene Bakterien sind die Erreger vieler Infektionskrankheiten des Menschen. Durch genetische Forschungen konnten schnellere Diagnosemethoden entwickelt werden; sie bilden auch die Grundlage für die Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe.

Molekulare Methoden zur Diagnose

Zu den wichtigsten Beiträgen der Molekularbiologie zählt die Entwicklung verbesserter Diagnosemethoden. In der Praxis versteht man unter *Diagnose* gewöhnlich, dass der Erreger einer Krankheit, ob Bakterium, Virus oder Einzeller, identifiziert wird. Einige pathogene Bakterien vermehren sich nur langsam oder überhaupt nicht, wenn man sie außerhalb ihrer Wirtsorganismen kultiviert. Viren sind obligate Parasiten und können daher nur dann im Labor vermehrt werden, wenn man entsprechend kultivierte Wirtszellen mit ihnen infiziert. Überdies erfordern verschiedene Mikroorganismen unterschiedliche Kulturmedien und -bedingungen. All diese Faktoren sorgen dafür, dass die herkömmlichen Identifikationsmethoden mit einem hohen Aufwand verbunden sind. Bei molekularen Methoden versucht man nicht die Krankheitserreger zu vermehren, sondern untersucht vielmehr Makromoleküle wie DNA, RNA oder Proteine. Einige der neuen Methoden erfolgen mithilfe der Antikörpertechnologie und wurden bereits in Kapitel 6 behandelt. Hier werden nun Methoden betrachtet, die auf Nucleinsäuren basieren.

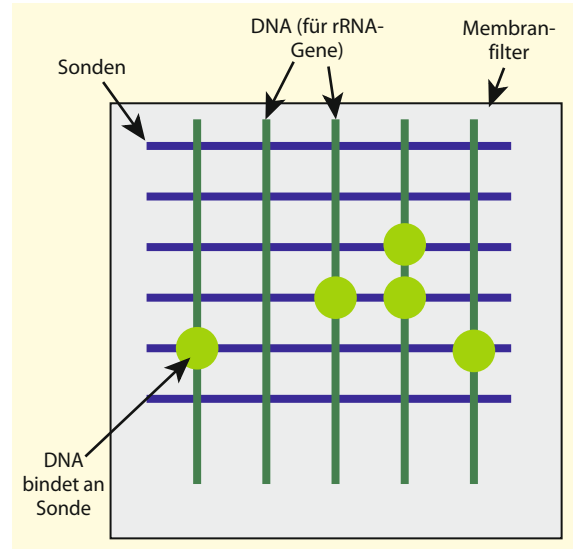
Für die molekularen Methoden ist es in der Regel erforderlich, aus den kultivierten Pathogenen oder einem infizierten Patienten DNA zu extrahieren. Diese DNA vermehrt man dann mittels PCR (s. Kap. 4) und analysiert sie durch Sequenzierung oder Hybridisierung. Somit kann man die gleichen Reagenzien und Methoden auf verschiedene Mikroorganismen anwenden. Darüber hinaus erweisen sich die molekularen Methoden häufig als schneller, genauer und empfindlicher als die klassischen mikrobiologischen Techniken. Die meisten der zur klinischen Diagnose eingesetzten molekularen Techniken wurden bereits an anderer Stelle in diesem Buch beschrieben. Hier geht es nun um ihre Anwendung.

Jede Organismenart zeichnet sich durch eine andere Sequenz ihrer **ssu-rRNA** (für engl. **small-subunit ribosomal RNA**) – 16S-rRNA bei Bakterien und 18S-rRNA bei Eukaryoten – aus. Daher kann man Bakterien und eukaryotische Parasiten anhand ihrer ssu-rRNA-Sequenzen identifizieren. Dazu wird das für die ssu-rRNA codierende Gen sequenziert und nicht die RNA selbst.

1. Das sogenannte **Ribotyping** kann durch eine detaillierte Restriktionsanalyse der rRNA-Gene realisiert werden. Dazu spaltet man die DNA

eines Bakterienstammes mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen und trennt die Fragmente anschließend durch Gelelektrophorese auf. Danach bringt man die Fragmente auf eine Membran auf und identifiziert die Banden mittels eines Southern Blots. Dazu wird eine Sonde verwendet, die einem Teil der 16S-rRNA-Sequenz entspricht. Viele Bakterien besitzen mehr als ein 16S-rRNA-Gen, sodass man bei jedem Verdau mehrere Banden erhält. Für diese Methode werden sehr große Mengen DNA benötigt.

2. Die Amplifikation der DNA mittels PCR und die anschließende DNA-Sequenzierung ermöglichen eine Identifikation mit nur geringen Mengen DNA. Mithilfe von Primern, die eine konservierte Region der 16S-rRNA erkennen, erzeugt man durch PCR einen Abschnitt des 16S-Gens. Das PCR-Fragment kann man dann sequenzieren und mit der Datenbank bekannter DNA-Sequenzen abgleichen. Hierbei ist zu beachten, dass man die gleiche Vorgehensweise und die gleichen Reagenzien auf alle bakteriellen Infektionen anwenden kann. Darüber hinaus funktioniert diese Methode auch bei Bakterien, die man nicht kultivieren kann. Varianten der PCR wie die RAPD-Technik (für engl. *randomly amplified polymorphic DNA*; für Details s. Kap. 4) können ebenfalls durchgeführt werden, um das Pathogen zu identifizieren. Für eine bakterielle RAPD-PCR wird häufig ein zufälliges Gemisch aus sechs Basen langen Primern verwendet. Dadurch lassen sich verschiedene Stämme derselben Bakterienart unterscheiden. Man hat damit unter anderem die Herkunft und Ausbreitung kontaminierender Bakterien in Nahrungsmitteln oder Trinkwasser verfolgt.
3. Die als **Checkerboard-Hybridisierung** bezeichnete Technik ermöglicht es, in einer einzigen Probe gleichzeitig mehrere Bakterien nachzuweisen und zu identifizieren. Dazu trägt man eine Reihe von Sonden, die jeweils unterschiedlichen Bakterien entsprechen, in horizontalen Linien auf eine Hybridisierungsmembran auf (Abb. 21.1). Mittels PCR amplifiziert man einen Teil des 16S-Gens des Zielbakteriums oder nutzt dazu klinische Proben, die ein Gemisch verschiedener Bakterien enthalten können. Anschließend markiert man die PCR-Fragmente mit einem Fluoreszenzfarbstoff und trägt sie vertikal auf die Membran auf. Nach Denaturierung und *annealing* zur Hybridisierung wird die ungebundene DNA von der Membran abgespült. Proben, die mit den Sonden hybridisieren, erscheinen als hell fluoreszierende Flecken.



21.1 Checkerboard-Hybridisierung

Sonden, die der 16S-rRNA jedes Kandidatenbakteriums entsprechen, werden in langen horizontalen Streifen an einen Membranfilter gebunden (pro Kandidat jeweils ein Streifen). Um eine Gruppe unbekannter Pathogene möglichst schnell zu identifizieren, wird gemischte DNA aus einer Probe extrahiert und durch PCR, mithilfe von Primern für 16S-rRNA, amplifiziert. Die PCR-Fragmente werden dann mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und in vertikalen Streifen aufgetragen. Dadurch ist jede Probe jeder Sonde ausgesetzt. Überall dort, wo ein 16S-PCR-Fragment mit einer 16S-Sonde übereinstimmt, binden die beiden aneinander und erzeugen am Schnittpunkt der beiden Streifen ein stark fluoreszierendes Signal.

Mithilfe von molekularen Techniken, insbesondere unter Verwendung von ribosomalen RNA-Sequenzen, kann man pathogene Bakterien schneller diagnostizieren als mit herkömmlichen Kulturtechniken.

Virulenzgene finden sich häufig auf mobilen DNA-Abschnitten

Viele Infektionskrankheiten werden von Bakterien verursacht, die in den menschlichen Körper eindringen. Manche pathogene Bakterien dringen ins

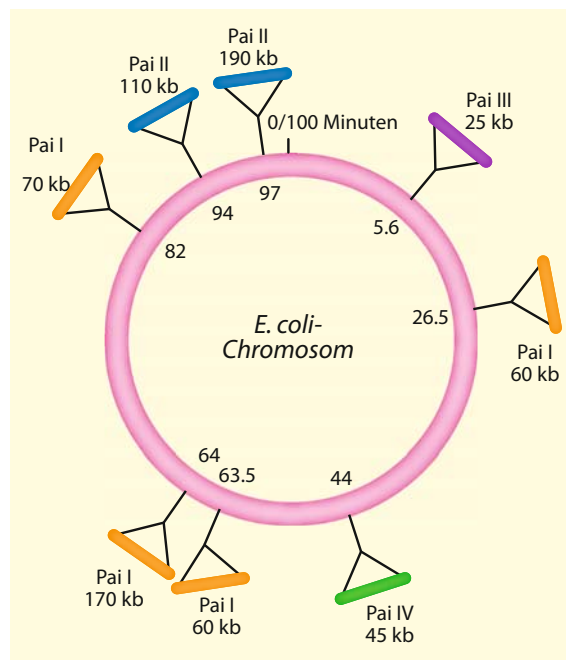
Innere von Wirtszellen ein, andere bleiben außerhalb und besiedeln den extrazellulären Raum. Im Detail weisen die an Infektionskrankheiten beteiligten molekularen Mechanismen große Unterschiede auf. Dennoch sehen sich die eindringenden Mikroorganismen mit ähnlichen Problemen konfrontiert und haben daher viele allgemeine Fähigkeiten gemeinsam. Eigenschaften, die es den Mikroorganismen ermöglichen, Infektionen zu verursachen, bezeichnet man als **Virulenzfaktoren**. Diese kann man in drei Hauptgruppen unterteilen: in Faktoren, die zum Eindringen in den Wirt benötigt werden, solche, die dem Überleben im Wirt dienen, und Faktoren zur Aggression gegen den Wirt.

Die für Virulenzfaktoren codierenden DNA-Abschnitte sind häufig mobil. In einigen Fällen (z.B. bei Milzbrand und Beulenpest) befinden sie sich auf **Virulenzplasmiden**. In anderen Fällen (z.B. beim Cholera toxin und Diphtherietoxin) werden sie von lysogenen Bakteriophagen übertragen und in die Chromosomen bestimmter Bakterienstämme eingebaut. Und in wieder anderen Fällen sind sie, flankiert von *inverted repeats* (gegenläufigen Sequenzwiederholungen), in bestimmten Regionen der Chromosomen gruppiert und werden als **Pathogenitätsinseln** bezeichnet (Abb. 21.2). Die gegenläufigen Sequenzwiederholungen lassen darauf schließen, dass die Pathogenitätsinseln als Einheit durch Transposition übertragen werden können. Gleiche oder nahe verwandte Virulenzfaktoren können bei einem Bakterienstamm chromosomal und bei anderen in Plasmide eingebaut sein.

Die Mobilität der Virulenzfaktoren hat mehrere Auswirkungen. Erstens gibt es zwischen nahe verwandten Bakterienstämmen enorme Unterschiede bezüglich ihrer Pathogenität. Harmlose Bakterienstämme, die nahe verwandt sind mit den bakteriellen Erregern von Cholera, Pest, Diphtherie, Milzbrand und so weiter, sind weit verbreitet, erhalten aber normalerweise nur wenig Aufmerksamkeit. Zweitens können Virulenzfaktoren auch auf bislang harmlose Stämme übertragen werden und so in einem oder mehreren Schritten neue Pathogene entstehen lassen. Handelt es sich bei dem harmlosen Stamm um einen engen Verwandten, so ergibt sich lediglich eine neue Variante einer alten Krankheit (z.B. sind die neuen Biotypen der Cholera, die im vergangenen Jahrhundert aufgetaucht sind, auf eine Übertragung des CTXphi-Phagen in harmlose Stämme von *Vibrio* zurückzuführen). Ist der Empfänger eines Abschnitts mit Virulenzfaktoren jedoch nicht mit dem bisherigen „Besitzer“ verwandt, kann

ein völlig neuer bakterieller Krankheitserreger entstehen. Wahrscheinlich entstand auf diese Weise vor einigen Tausend Jahren der Erreger der Pest, *Yersinia pestis*. Offenbar wurde eine ancestrale Form von *Yersinia*, die leichte Darminfektionen verursachte, durch die Aufnahme von zwei Virulenzplasmiden zu einem verheerenden Krankheitserreger transformiert, der von Flöhen direkt in den Blutstrom übertragen wird.

Die Gene für bakterielle Virulenzfaktoren befinden sich häufig auf mobilen DNA-Abschnitten. Das heißt, sie finden sich auf Plasmiden, eingebauten Viren, transponierbaren Elementen oder Pathogenitätsinseln und sind kein dauerhafter Bestandteil der Bakterienchromosomen.



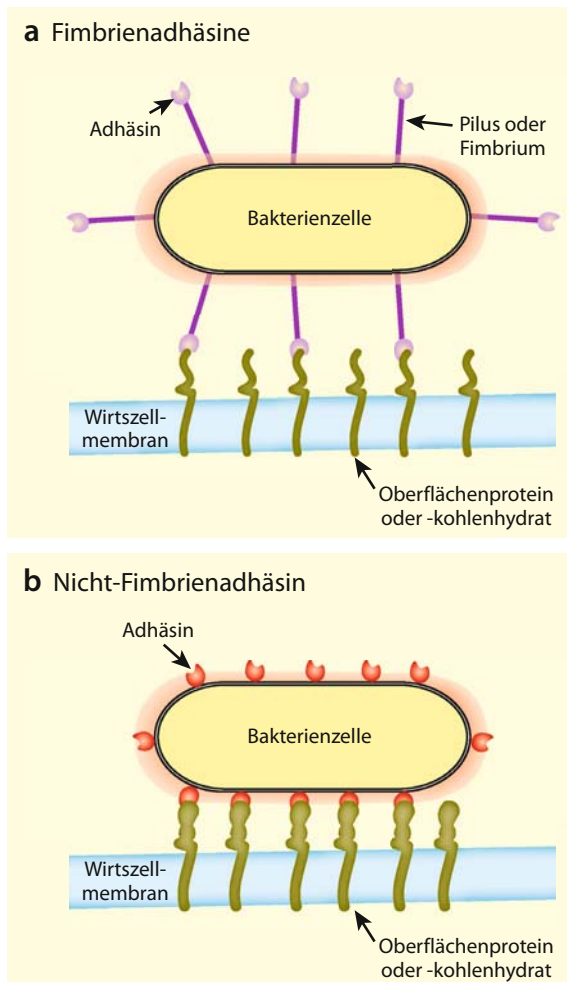
21.2 Pathogenitätsinseln von *Escherichia coli*

Verschiedene Stämme von *E. coli* unterscheiden sich sehr in ihrer Pathogenität. Pathogene *E. coli* sind durch einzigartige DNA-Regionen gekennzeichnet, die sich bei nichtpathogenen Stämmen nicht finden; diese bezeichnet man als Pathogenitätsinseln (PAI). Die Regionen sind mit I–IV bezeichnet. I codiert für α -Hämolysin, II codiert für α -Hämolysin und Fimbrien, III codiert für Fimbrien und IV codiert für das System zur Eisenchelatbildung von Yersiniabactin.

Adhäsion und Eindringen pathogener Bakterien

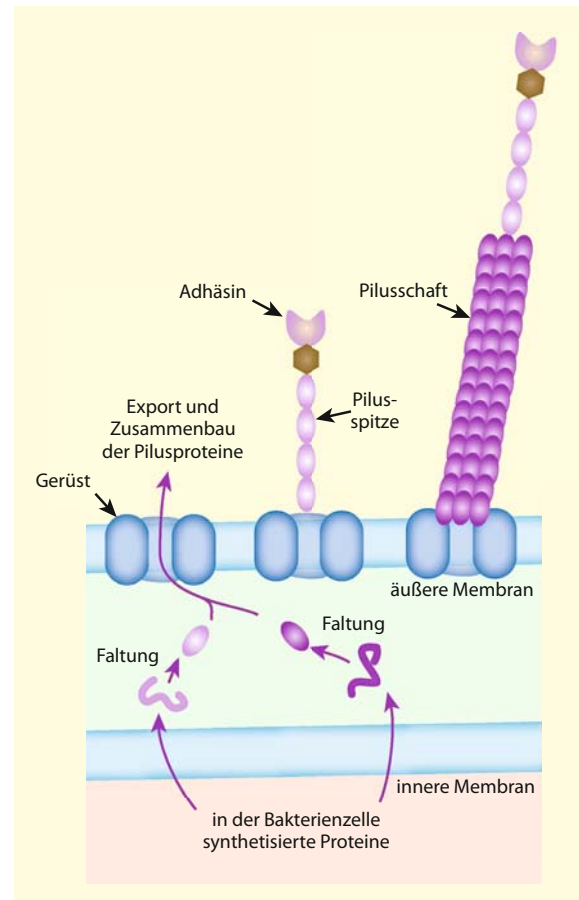
Bei vielen Infektionen besteht der erste Schritt darin, dass sich die Bakterien an die Oberflächen von Zellen des Wirtstieres anheften. Ermöglicht wird dies durch Proteine, die man als Adhäsine bezeichnet. Normalerweise binden diese an Zuckerreste von Glykoproteinen oder Glykolipiden an der Oberfläche

tierischer Zellen. Man unterscheidet zwei Haupttypen von Adhäsinen: Fimbrienadhäsine und Nicht-Fimbrienadhäsine (Abb. 21.3). **Pili** (Singular Pilus) oder **Fimbrien** (Singular Fimbrie) sind dünne, von der Oberfläche von Bakterienzellen abstehende Filamente (Abb. 21.4). Ihr Schaft besteht aus helikal angeordneten Untereinheiten des Proteins **Pilin**. An ihrer Spitze tragen sie mehrere spezialisierte Proteine, darunter auch **Adhäsine**. Nicht-Fimbrienadhäsine finden sich auf der Oberfläche von Bakterienzellen. In vielen Fällen entsteht über die Pili der erste Kon-



21.3 Bakterielle Adhäsine

a Die Oberfläche mancher Bakterienzellen ist von Pili (Fimbrien) bedeckt. Diese bestehen aus dem helikal angeordneten Protein Pilin. An der Spitze der Pili befinden sich Adhäsine, welche die Glykoproteine an der Oberfläche der Wirtszelle erkennen. **b** Nicht-Fimbrienadhäsine finden sich direkt auf der Oberfläche der Bakterienzelle.



21.4 Aufbau eines Bakterienpili

Der Pilus besteht aus zwei Abschnitten, der Spitze und dem Schaft, die an der Außenseite des Bakteriums zusammengebaut werden. Die Proteinuntereinheiten des Pilus werden im Cytoplasma synthetisiert und durch beide Membranen hindurch exportiert. Gefaltet werden die Proteine im periplasmatischen Raum. Der Aufbau eines Pilus erfolgt von der Spitze zur Basis hin, ausgehend von Adhäsion und anderen Proteinen der Spitze; darunter werden dann mehrere Lagen Pilin ergänzt.

takt mit der Wirtszelle, und die Nicht-Fimbrienadhäsine sind für eine spätere, engere Phase der Bindung zuständig.

Ein zweiter häufiger Infektionsschritt ist das Eindringen in eine tierische Zelle. Nicht alle Bakterien, die sich an die Oberfläche tierischer Zellen anheften, vermögen auch in diese einzudringen. Einige Pathogene verbleiben dauerhaft außerhalb der Wirtszellen. Ein klassisches Beispiel ist das Cholera-Bakterium. Hier bleiben die Bakterien im Darmlumen, angeheftet an die Außenseiten der Darmzellen. Nur das Toxin dringt in die Darmzellen ein und ruft die Symptome der Krankheit hervor (s. weiter unten). Andere Pathogene bedienen sich unterschiedlicher Strategien, um in die Wirtszellen einzudringen. So kommt es teilweise vor, dass normalerweise phagocytierende tierische Zellen (wie viele amöboide Zellen des Immunsystems) Bakterien zwar aufnehmen, diese aber nicht vernichten können. In anderen Fällen bringen Bakterien tierische Zellen mithilfe von Proteinen, die man **Invasine** nennt, dazu, sie aufzunehmen. So bindet beispielsweise das Invasin von *Yersinia* an die Integrinproteine auf der Oberfläche von Säugetierzellen und vermittelt die Internalisierung der Bakterien.

Die zunehmende Ausbreitung von Resistenzen gegen Antibiotika hat Wissenschaftler dazu veranlasst, nach alternativen Methoden zur Behandlung von Infektionen zu suchen. So wurden mehrfach Vorschläge unterbreitet, sich Adhäsine und Invasine zunutze zu machen und den Spieß gegen die eindringenden Bakterien umzudrehen. Da sich diese Versuche noch weitgehend in der Testphase befinden, sollen hier einige Beispiele kurz erläutert werden.

Durch Analyse der Bindung in Kombination mit Röntgenkristallographie lassen sich Details der molekularen Ziele der Adhäsine aufdecken. So bindet beispielsweise das FimH-Adhäsин pathogener *Escherichia coli* Mannosereste an der Oberfläche der Glykoproteine von Säugetieren. Mehrere Alkyl- und Arylmannosederivate binden mit extrem hoher Affinität an das Adhäsин und können die Anheftung an den natürlichen Rezeptor blockieren. Mannosederivate könnten die Grundlage für die Entwicklung von Anti-Adhäsин-Medikamenten sein, welche die Bindung von Bakterien verhindern.

Als weiterer Schritt wurde vorgeschlagen, gentechnisch harmlose Darmbakterien herzustellen, etwa nichtpathogene Stämme von *E. coli*, und auf deren Zelloberflächen die Zieloligosaccharide für die Adhäsine zu exprimieren. Dann würden pathogene Bakterien sich statt an Säugetierzellen an diese Köder anheften. Dadurch ließe sich vermeiden, kostspielige

Zuckerderivate verabreichen zu müssen, denn die Köderstämme von *E. coli* würden sich im Darm auf natürliche Weise vermehren. Zusätzlich könnte einer der produzierten Köderstämme mehrere Adhäsинziele tragen.

Als dritte Möglichkeit bietet sich an, nichtpathogene Stämme von *E. coli* mit Genen für Adhäsine und/oder Invasine von Pathogenen auszustatten. Diese harmlosen Stämme würden dann mit den Pathogenen in Konkurrenz treten und die Rezeptoren blockieren. Mithilfe solcher modifizierten Stämme könnte man auch Proteinpharmazeutika oder große DNA-Abschnitte zur Gentherapie in Säugetierzellen einschleusen. Die eingedrungenen *E. coli* würden dann von den Säugetierzellen verdaut und ihre therapeutische Fracht auf diese Weise freigesetzt.

Bakterien heften sich mithilfe von Proteinen, sogenannten Adhäsinen, an die Oberfläche von Wirtszellen an. Andere, als Invasine bezeichnete Proteine ermöglichen das Eindringen in die Wirtszelle. Sowohl Adhäsine als auch Invasine bilden potenzielle Ziele für neue Antibiotika, wurden bislang aber noch nicht mit Erfolg eingesetzt.

Aufnahme von Eisen durch pathogene Bakterien

Fast alle Bakterien benötigen Eisen als Cofaktor für viele Enzyme, vor allem für jene der Atmungskette. Die Konzentration von freiem Eisen im Körper (einschließlich des im Blut enthaltenen) wird durch spezialisierte Proteine niedrig gehalten. Diese Proteine binden Eisen sehr fest. Überschüssiges Eisen wird durch **Transferrin** und **Lactoferrin** gebunden, die als Eisentransporter fungieren, oder durch das Eisenspeicherprotein **Ferritin**.

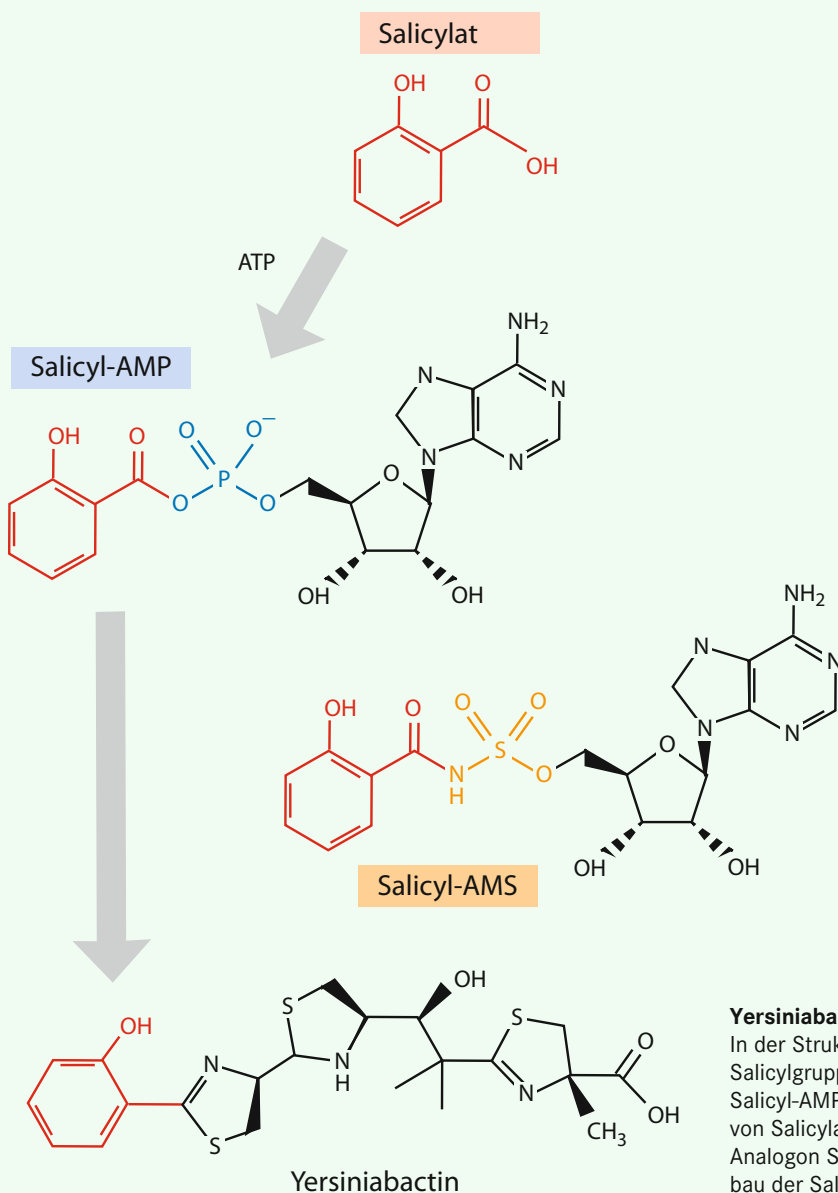
Bakterien binden Eisen mithilfe von Chelatbildnern, den sogenannten **Siderophoren**, und extrahieren es, wenn nötig, aus Proteinen ihres Wirtes. Die Siderophoren werden von den Bakterien sezerniert, binden Eisen und werden anschließend durch spezialisierte Transportsysteme wieder in die Bakterienzelle zurücktransportiert. Die meisten Bakterien verfügen über verschiedene solcher Eisentransportsysteme, die jeweils bei unterschiedlichen Bedingungen zum Einsatz kommen. Das vielleicht am besten bekannte Siderophor ist **Enterochelin** (oder **Enterobactin**),

Exkurs 21.1

Gezielte Entwicklung neuer Antibiotika

Fehlen den Erregern von Pest und Tuberkulose die hoch effektiven Siderophoren, so büßen sie ihre Virulenz weitgehend ein. Da Säugetiere keine Siderophoren produzieren, bilden ihre einzigartigen Biosynthesewege ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer Antibiotika. Bei mehreren höchst effizienten Siderophoren, darunter Mycobactin und Yersiniabactin, sitzt auf der Siderophorstruktur eine Salicylgruppe (Abb.). Das Salicylat wird durch ATP aktiviert, wodurch Salicyl-AMP entsteht. Durch

gezielte chemische Synthese von Substratanaloga, bei denen das Salicylat über eine Sulfamoylgruppe (anstelle von Phosphat) mit Adenosin verbunden ist, lassen sich äußerst aktive und spezifische Inhibitoren der Siderophorsynthese herstellen. Diese verhindern die Vermehrung von *Mycobacterium* und *Yersinia* bei Eisenmangel. Man hofft, durch diesen Ansatz neue Inhibitoren entwickeln zu können, die man gegen antibiotikaresistente Pathogene einsetzen kann.

**Yersiniabactin und Salicyl-AMP**

In der Struktur von Yersiniabactin ist die Salicylgruppe rot dargestellt. Die Vorstufe Salicyl-AMP entsteht durch Aktivierung von Salicylat durch ATP. Das Sulfamoyl-Analogon Salicyl-AMS inhibiert den Einbau der Salicylgruppe in Yersiniabactin.

Tabelle 21.1 Beispiele für bakterielle Toxine vom A-B-Typ

Toxin und Organismus	Struktur und Wirkungsweise
Choleratoxin <i>Vibrio cholerae</i>	AB ₅ ADP-Ribosylierung des G-Proteins, das Adenylat-Cyclase kontrolliert
Pertussistoxin <i>Bordetella pertussis</i>	A'B' ₅ (fünf nichtidentische B-Untereinheiten) ADP-Ribosylierung des G-Proteins, das Adenylat-Cyclase kontrolliert
Shigatoxin <i>Shigella</i>	AB ₅ Abspaltung von Adenin von 28S-rRNA; Hemmung der Proteinsynthese
Diphtherietoxin <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	A-B (A = N-terminale Domäne) ADP-Ribosylierung des Translationsfaktors EF2; Hemmung der Proteinsynthese
Exotoxin A <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A-B (A = C-terminale Domäne) ADP-Ribosylierung des Translationsfaktors EF2; Hemmung der Proteinsynthese
Botulinustoxin <i>Clostridium botulinum</i>	A-B Zn-abhängige Protease, die Proteine in den Synapsen von Nerven spaltet und so in peripheren Nerven die Signalübertragung blockiert
Ödemtoxin <i>Bacillus anthracis</i>	A-B ₇ (Ödemfaktor plus protektives Antigen) Adenylat-Cyclase-Aktivität
Letaltoxin <i>Bacillus anthracis</i>	A-B ₇ (Letalfaktor plus protektives Antigen) Protease, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen (MAPKKs) spaltet

Bakterien bildet. Werden solche Bakterien vom Immunsystem abgetötet, zerfallen ihre Zellwände und setzen das LPS frei. Der CD14-Rezeptor auf den Immunzellen bindet das LPS, was die Ausschüttung von Cytokinen auslöst. Bei gleichzeitiger Zerstörung zahlreicher Bakterien werden große Mengen LPS frei und können einen septischen Schock auslösen.

Dennoch produzieren die meisten pathogenen Bakterien ein Toxin oder mehrere Toxine, die Zellen ihres Wirtes gezielt abtöten oder schädigen sollen. Weil diese von noch lebenden Bakterien abgegeben werden, spricht man von **Exotoxinen** (oder Ekto-toxinen). Bei den meisten bakteriellen Exotoxinen handelt es sich um Proteine, die sich anhand ihres Wirkortes in drei Gruppen unterteilen lassen:

1. **Typ-I-Toxine** dringen nicht in die Zielzelle ein. Sie lösen durch die Bindung an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche eine abträgliche Reaktion aus. So produzieren zum Beispiel einige pathogene Stämme von *E. coli*, die Diarrhö verursachen, das hitzestabile Toxin a (St_a). Dieses Hormonanalogen bindet an Guanylat-Cyclase in der Zellmembran tierischer Zellen und bewirkt eine Überproduktion von zyklischem GMP.
2. **Typ-II-Toxine** wirken auf die Zellmembran der Zielzellen ein. Einige bauen Membranlipide ab, andere erzeugen Poren in der Membran. Einige pathogene *E. coli*-Stämme, die Nierenschäden hervorrufen, synthetisieren beispielsweise Hämoly-

lysin A. Dieses erhielt seinen Namen, weil es die Lyse roter Blutkörperchen bewirken kann, es zerstört jedoch auch die Membranen zahlreicher anderer tierischer Zellen.

3. **Typ-III-Toxine** dringen in die Zielzelle ein. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten: einem toxischen Faktor (A-Protein; A für „aktiv“) sowie einer Untereinheit, welche die Bindung vermittelt (B-Protein; B für „Bindung“). A- und B-Protein können separate Moleküle sein oder auch verschiedene Domänen eines einzelnen Proteins. Bisweilen wird die Bindung auch durch mehrere B-Untereinheiten vermittelt; andererseits kennt man aber auch Fälle, bei denen mehrere A-Proteine dieselbe Untereinheit für die Bindung gemeinsam haben (Tabelle 21.1). Diese Toxine sind aus molekularer Sicht am interessantesten. Daher sollen einige ausgewählte Beispiele dafür detaillierter besprochen werden.

Es sind zahlreiche Bakterientoxine bekannt. Endotoxin bildet den Lipid-A-Anteil von Lipopolysaccharid. Die Proteintoxine werden danach unterteilt, ob sie von außen auf die Zielzelle einwirken, die Membran schädigen oder in die Zelle eindringen. Die meisten der in die Zielzelle eindringenden Toxine bestehen aus toxischen Untereinheiten und Bindungsproteinen.

ADP-ribosylierende Toxine

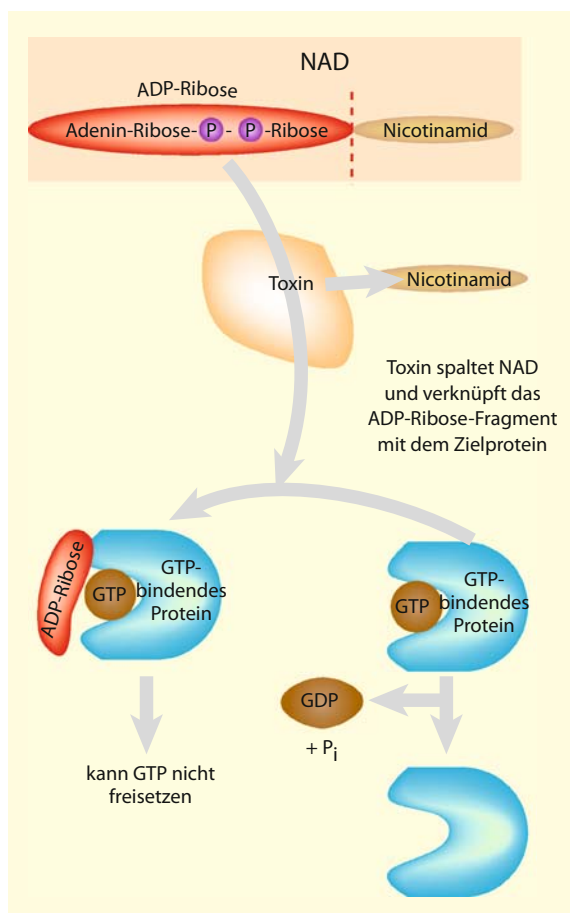
Eine große Familie von Toxinen hydrolysiert den Cofaktor NAD zu Nicotinamid und **ADP-Ribose**. Anschließend überträgt das Toxin den ADP-Ribose-Anteil auf ein Akzeptormolekül, in der Regel ein GTP-bindendes Protein. Dadurch verbleibt das Zielprotein in seiner GTP-bindenden Konformation und kann nicht mehr seine normale Funktion erfüllen (Abb. 21.6). **Choleratoxin** und **Diphtherietoxin** arbeiten mittels **ADP-Ribosylierung**, allerdings haben sie unterschiedliche Ziele. Choleratoxin inaktiviert das G-Protein, das die Adenylat-Cyclase in tierischen Zellen kontrolliert, Diphtherietoxin greift dagegen den

Elongationsfaktor EF-2 an, einen in vielen eukaryotischen Zellen zur Proteinsynthese benötigten Translationsfaktor. Ursprünglich ging man davon aus, dass die toxische Wirkung solcher Toxine, die NAD verwenden, lediglich auf der Zerstörung von NAD beruht. Tatsächlich wird durch hohe Toxinkonzentrationen das gesamte NAD einer Zelle hydrolysiert, die eigentliche letale Wirkung tritt jedoch bereits bei einer sehr viel geringeren Toxinkonzentration ein und ist auf die ADP-Ribosylierung der Zielproteine zurückzuführen.

Die Gene für Choleratoxin und Diphtherietoxin sind nicht Bestandteil des Bakteriengenoms. Sie befinden sich vielmehr auf lysogenen Viren, deren DNA in das Bakterienchromosom eingebaut ist. Nur Bakterien mit dem Bakteriophagen produzieren das Toxin, alle Bakterien ohne den Phagen sind nichtpathogen.

Bestimmte andere Bakteriophagen besitzen Enzyme, die NAD zur ADP-Ribosylierung von Proteinen ihrer Bakterienwirte verwenden. Gewöhnlich sind mehrere Bakterienproteine modifiziert, sodass oft nicht sicher ist, bei welchem es sich um das eigentliche Ziel handelt. Das Blockieren entscheidender zellulärer Enzyme kann den Stoffwechsel des Wirtes stark beeinträchtigen. Die ADP-Ribosylierung hat aber auch noch einen komplexeren Effekt: die Modifizierung von DNA- oder RNA-Polymerasen des Wirtes, sodass diese ihre Spezifität ändern. Beispielhaft hierfür sei der Bakteriophage T4 genannt, der die RNA-Polymerase seines Wirtes *E. coli* ADP-ribosyliert. Daraufhin verliert die RNA-Polymerase weitgehend ihre Fähigkeit, *E. coli*-Gene zu transkribieren, funktioniert aber nach wie vor problemlos bei T4-Genen. Wie die Ziele von Cholera- und Diphtherietoxin bindet auch RNA-Polymerase GTP, obgleich lediglich als eines von mehreren möglichen Nucleotiden.

Viele Toxine entfalten ihre Wirkung durch Anhängen einer von NAD stammenden ADP-Ribose-Gruppe an ein Zielprotein. Dieses Ziel ist im Allgemeinen ein GTP-nutzendes Enzym, dessen Aktivität durch die Anwesenheit der ADP-Ribose blockiert wird.



21.6 ADP-ribosylierende Toxine

In Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) ist ADP-Ribose an Nicotinamid gebunden. Diese Bindung wird durch einige Bakterientoxine gespalten und die ADP-Ribose mit einem GTP-bindenden Protein verknüpft, was eine Abspaltung des GTP verhindert.

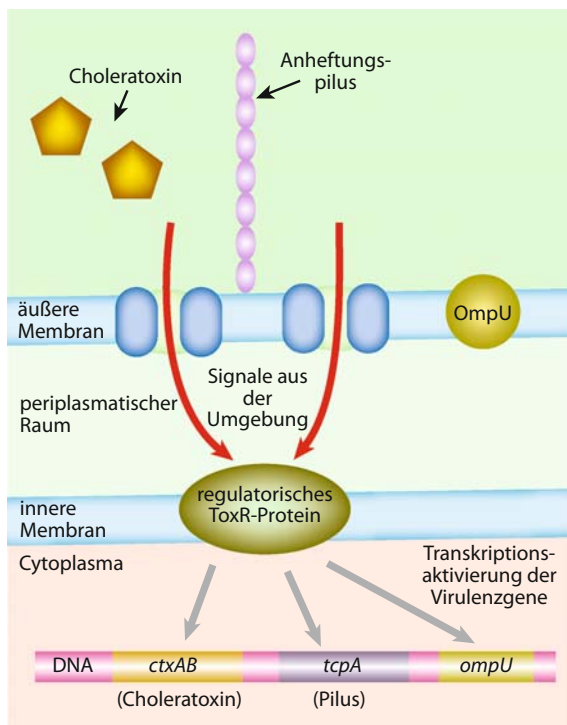
Choleratoxin

Das Cholerabakterium *Vibrio cholerae* dringt nicht in die Gewebe seines Wirtes ein. Es heftet sich an die Außenseite der Epithelzellen des Dünndarms an und verbleibt dort. Schäden entstehen durch die Sekretion des Choleratoxins. Dieses greift die Zellen des Dün-

darmepithels an und bewirkt, dass diese Natriumionen und Wasser in den Darmtrakt abgeben. Zu den klinischen Symptomen von Cholera zählt der Verlust von Körperflüssigkeiten durch massiven Durchfall, der schließlich zum Tod durch Austrocknung führt.

Die Virulenzproteine von *Vibrio cholerae* umfassen sowohl Choleratoxin als auch Adhäsine an der Zelloberfläche und in den Pili zur Anheftung an die Darmzellen. Die Gene für das Choleratoxin trägt der filamentöse Bakteriophage **CTXphi**, der *Vibrio cholerae* lysogenisiert. Die Synthese der Adhäsine und des Toxins untersteht einer gemeinsamen Regulation durch das ToxR-Protein in der inneren Bakterienmembran. Dieses stellt fest, ob sich das Bakterium im Darm eines Tieres befindet (anhand von Temperatur, pH und Gallensalzen), und aktiviert die Virulenzgene (Abb. 21.7). Die interne Domäne des ToxR-Proteins bindet direkt an den Promotor dieser Gene.

Das Choleratoxin besteht aus den beiden Proteinen A und B, codiert durch die *ctxAB*-Gene (Abb. 21.8). Das ursprüngliche A-Protein wird durch

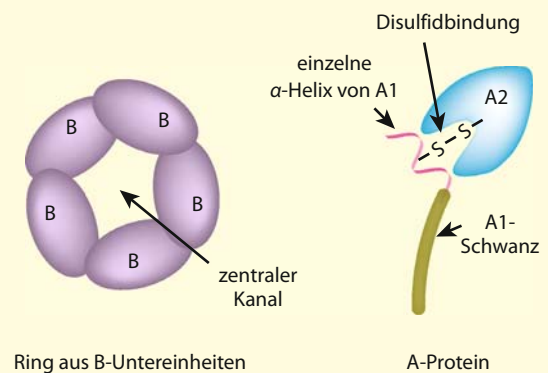


21.7 Regulation der Virulenzgene von *Vibrio cholerae*

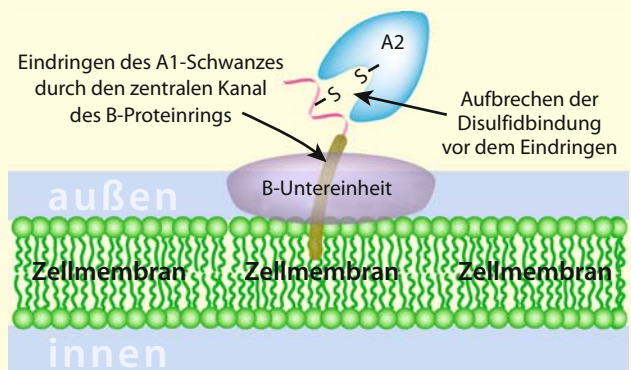
Das ToxR-Protein von *V. cholerae* ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert und stellt fest, ob sich die Zelle in einem menschlichen Wirt befindet. Dann aktiviert es direkt die Gene für Choleratoxin und die Anheftung.

eine Protease in A1 (23,5 kDa) und A2 (5,5 kDa) gespalten, die über eine einzelne Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben. Fünf B-Proteine (11,6 kDa) bilden eine ringförmige Struktur. Das A1-S-S-A2-Protein ragt durch den Ring aus den fünf B-Untereinheiten hervor. Choleratoxin bindet in eukaryotischen Zellmembranen an ein Glykolipid – **Gangliosid GM1**. Jede B-Untereinheit bindet an das Galactoseende eines Gangliosidmoleküls. Nach

a Bestandteile des Choleratoxins



b Eindringen des Choleratoxins



21.8 Struktur des Choleratoxins und Eindringen in die Zelle

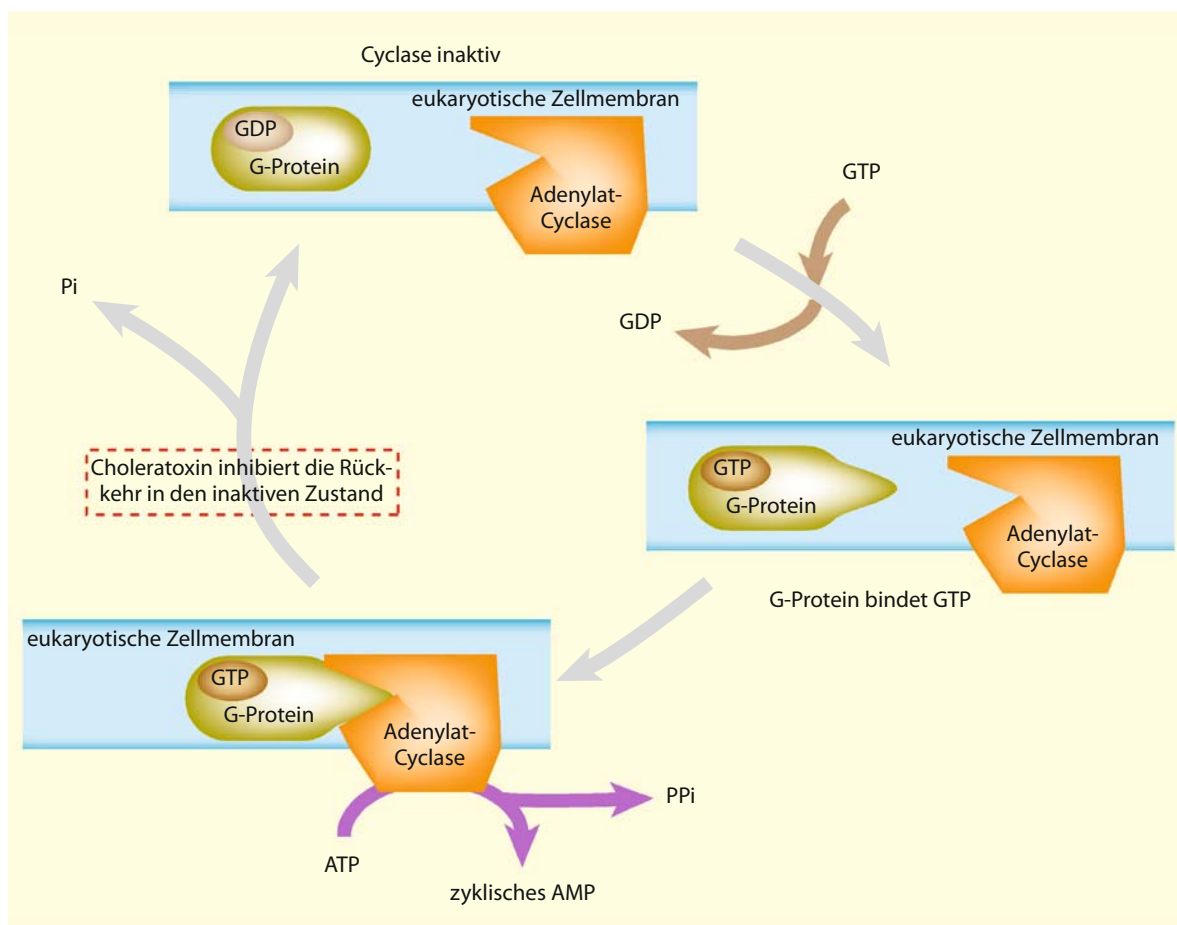
a Choleratoxin besteht aus einem A-Protein und fünf Kopien des B-Proteins. Das A-Protein wird in zwei Hälften (A1 und A2) gespalten und durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten. Das B-Protein bildet einen Ring mit einem zentralen Kanal für das A1-S-S-A2-Protein. **b** Choleratoxin bindet an die Wirtszelle, wenn die fünf B-Untereinheiten das Gangliosid GM1 erkennen. Dann bricht die Disulfidbindung von A1-S-S-A2 auf, und A1 kann in die Zelle eindringen.

Bindung des A1A2/B₅-Komplexes an die Cytoplasmamembran wird A1 durch Reduktion der Disulfidbindung von A2 abgetrennt und dringt in die Zelle ein. Das freie B-Protein schützt eukaryotische Zellen durch die Konkurrenz um GM1-Bindungsstellen vor dem Toxin.

Nach Eindringen in die Darmzelle spaltet Cholera toxin NAD in Nicotinamid und ADP-Ribose, die dann zur ADP-Ribosylierung von Zielmolekülen dient. Das A1-Protein des Cholera toxins kann tatsächlich ganz verschiedene Akzeptoren ADP-ribosylieren, darunter freies Arginin und seine Derivate sowie zahlreiche Proteine. Zudem ADP-ribosyliert das A1-Protein auch sich selbst und steigert dadurch seine Aktivität um 50 %. Das echte, *in vivo* letale Ziel

ist ein an der Regulation von **Adenylat-Cyclase** beteiligtes **G-Protein** (Abb. 21.9).

Normalerweise bindet das G-Protein nach Aktivierung durch ein Signal von außerhalb der Zelle zunächst GTP und anschließend an Adenylat-Cyclase und aktiviert diese. Die Hydrolyse von GTP ermöglicht die Freisetzung des G-Proteins von der Adenylat-Cyclase und führt zu ihrer Deaktivierung. Durch die ADP-Ribosylierung eines Argininrestes durch Cholera toxin wird die GTP-Hydrolyse verhindert, und das G-Protein bleibt in seinem GTP-bindenden Zustand. Das führt zu einer Hyperaktivierung der Adenylat-Cyclase und zu einer Überproduktion an zyklischem AMP. Dadurch gehen letztendlich Natriumionen und Wasser verloren.



21.9 Wirkungsmechanismus des Cholera toxins

In ihrem inaktiven Zustand binden G-Proteine GDP. Wird ein G-Protein durch ein externes Signal aktiviert, so wird das GDP gegen GTP ausgetauscht. Das G-Protein aktiviert nun Adenylat-Cyclase. Normalerweise wird das GTP hydrolysiert, und das G-Protein kehrt wieder in seinen inaktiven Zustand zurück. Cholera toxin spaltet NAD und hängt die ADP-Ribose-Gruppe an ein Arginin im G-Protein an. Dies verhindert die Abspaltung von GTP von dem G-Protein. Folglich wird Adenylat-Cyclase nicht abgeschaltet und produziert weiter zyklisches AMP.

GTP-Analoga, die nicht hydrolysiert werden können (wie GMP-P-NH-P oder GMP-P-CH₂-P) zeigen ähnliche Wirkungen wie Cholera toxin.

Cholera toxin und die hitzeempfindlichen **Enterotoxine** anderer Darmbakterien sind im Grunde Varianten desselben Toxins, allerdings ist Cholera toxin effizienter. Die Gene für die hitzelabilen Enterotoxine, die bei einigen pathogenen Stämmen von *E. coli* vorkommen, liegen auf dem Ent-Plasmid, das zwischen verschiedenen Stämmen übertragen werden kann. Diese Toxine haben ähnliche Aminosäuresequenzen wie Cholera toxin und bewirken durch den gleichen Mechanismus einen Flüssigkeitsverlust im Darm.

Die Gene für Cholera toxin liegen auf einem in das Bakterienchromosom eingebauten Virus. Das Toxin hängt an ein G-Protein des Wirtes, das Adenylat-Cyclase reguliert, eine ADP-Ribose an. Durch eine Überproduktion von zyklischem AMP kommt es zu einer Austrocknung.

Milzbrandtoxin

Milzbrand wird durch das grampositive Bakterium *Bacillus anthracis* verursacht, das erste Bakterium, das als Erreger einer Krankheit nachgewiesen wurde. Im Jahr 1877 züchtete Robert Koch diese Mikroorganismen in Reinkultur und wies nach, dass sie Sporen bilden können. Außerdem injizierte er die Bakterien in Tiere und rief dadurch Milzbrand hervor. Zu den Virulenzfaktoren von Milzbrand gehören die Exotoxine und die Kapsel, die beide auf Plasmiden lokalisiert sind. Es existieren zwei Plasmide: pXO1 trägt die regulatorischen Gene und Strukturgene für die Exotoxine und pXO2 trägt die Gene für die Kapsel. Die aus Poly-D-glutaminsäure bestehende Kapsel schützt gegen Angriffe durch Zellen des Immunsystems. Wie sich bei einer Sequenzierung des Chromosoms gezeigt hat, weist *Bacillus anthracis* abgesehen von seinen Virulenzplasmiden bemerkenswerte Ähnlichkeiten zu anderen *Bacillus*-„Arten“ auf, etwa zu *B. cereus* (ein verbreitetes Bodenbakterium) und *B. thuringiensis* (das besonders wegen der Produktion von Toxinen mit Insektizidwirkung bekannt ist, die bei transgenen Pflanzen zum Einsatz kommen; s. Kap. 14).

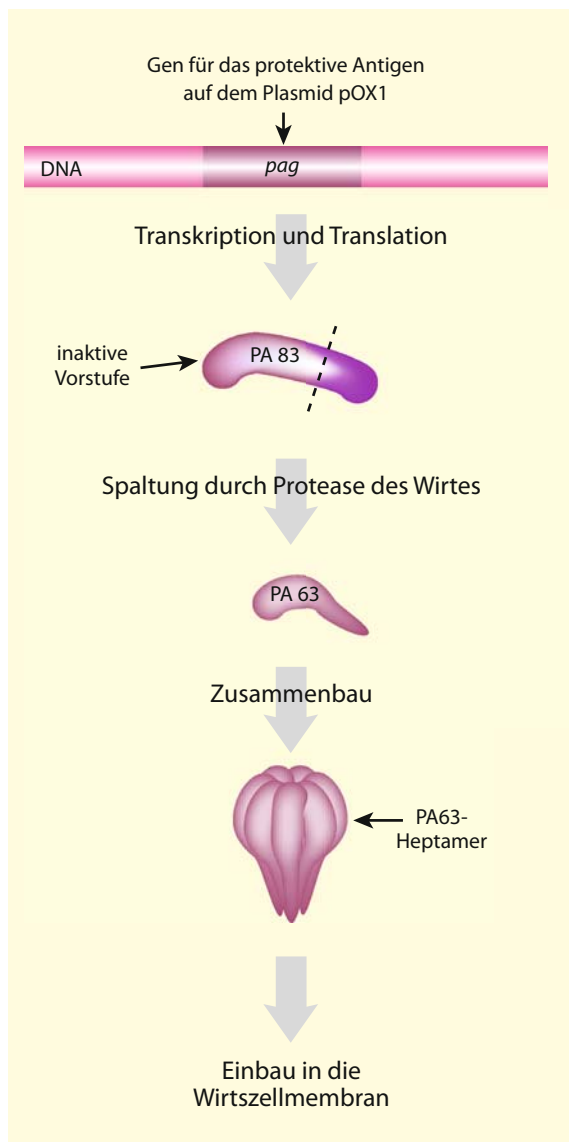
Die Gene für die bekannten Virulenzfaktoren von *B. anthracis* umfassen nur einen geringen Pro-

zentsatz der DNA von pXO1 und pXO2. So enthält zum Beispiel das Plasmid pXO1 (184 kb) 143 vorhergesagte Gene sowie eine Pathogenitätsinsel von 45 kb, begrenzt von gegenläufigen Sequenzwiederholungen. In dieser Region liegen die drei Gene *pag*, *lef* und *cya*, die für das Bindungsprotein beziehungsweise die beiden Exotoxine codieren. Die Transkription der Toxingene wird von zwei regulatorischen Genen mit *trans*-Wirkung – *atxA* und *atxR* – kontrolliert. Die Toxinsynthese reagiert auf die Konzentration von Bicarbonat/Kohlendioxid und die Temperatur. Diese Faktoren zeigen an, ob die Milzbrandbakterien in ein warmblütiges Tier eingedrungen sind.

Die Milzbranderreger produzieren zwei verschiedene Toxinproteine, den **Ödemfaktor** (EF; engl. *edema factor*) und den **Letalfaktor** (LF; engl. *lethal factor*). Diese haben beide das gleiche Bindungsprotein gemeinsam, das **protektive Antigen** (PA). Das Ödemtoxin besteht aus dem Ödemfaktor plus PA, das Letaltoxin aus dem Letalfaktor und PA. Das protektive Antigen entspricht also dem B-Protein anderer Toxine, denn es erkennt die Wirtszelle und bindet an sie. PA bildet einen Ring aus sieben Untereinheiten mit einem zentralen Hohlraum, durch den die toxischen Faktoren in die Zielzelle eindringen. Bei seiner Synthese liegt das PA-Protein zunächst als inaktives Monomer vor (83 kDa). Zur Aktivierung muss es von einer Protease des Wirtes gespalten werden, wodurch die 63-kDa-Form entsteht (PA63). Diese kann oligomerisieren und sich in die Zellmembranen des Wirtes einbauen (Abb. 21.10).

Der Ödemfaktor fungiert als Adenylat-Cyclase. Für sich alleine wirkt er nicht tödlich, aber er erhöht die toxische Wirkung des Letalfaktors. Wie sein Name schon impliziert, wirkt der Letalfaktor an sich schon tödlich, bei fehlendem Ödemfaktor werden allerdings höhere Dosen benötigt. Der Letalfaktor ist eine Protease und spaltet mehrere Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen (MAPKKs) wie MEK1, MEK2 und MKK3, die bei Tieren an der Kontrolle der Zellteilung beteiligt sind. Die Spaltung erfolgt innerhalb der N-terminalen prolinreichen Region, die der Kinasedomäne vorausgeht. Dadurch wird die zur Signalübertragung bei Protein-Protein-Wechselwirkungen benötigte Domäne zerstört. Die tödliche Wirkung des Milzbrandtoxins beruht auf der Lyse von Makrophagen, die für dieses Toxin besonders empfindlich sind. Dadurch werden wiederum große Mengen von Interleukinen ausgeschüttet. Diese rufen einen Schockzustand mit Versagen von Atmung und/oder Herz hervor.

Beim Milzbrandtoxin weisen zwei toxische Proteine die gleiche Untereinheit zur Bindung an den Rezeptor auf. Der Ödemfaktor ist eine Adenylat-Cyclase, der Letalfaktor spaltet regulatorische Proteine des Wirtes. Die Gene für die Untereinheiten des Milzbrandtoxins liegen auf Plasmiden.



21.10 Aktivierung des protektiven Antigens

Das auf dem pOX1-Plasmid liegende *pag*-Gen codiert für das protektive Antigen (PA) von *Bacillus anthracis*. PA wird in Form einer inaktiven Vorstufe synthetisiert, die gespalten und zu einer Ringstruktur zusammengebaut wird.

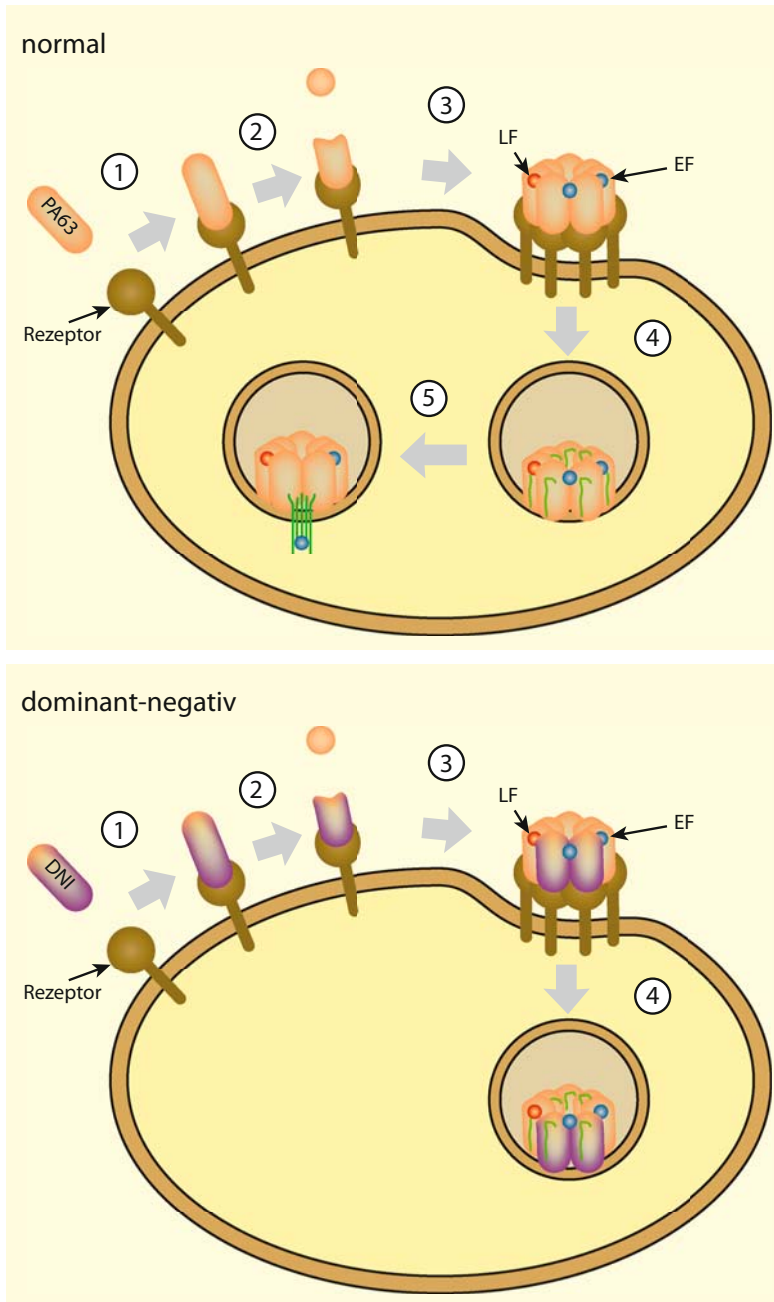
Antitoxintherapie

Selbst nachdem eine Infektion erfolgt ist und die eindringenden Bakterien Toxine sezerniert haben, gibt es noch Möglichkeiten, den Patienten vor den Toxinen zu schützen. Herkömmlich verwendete man zur Antitoxinbehandlung Antikörper gegen die Bakterientoxine. Inzwischen werden jedoch neue, genorientierte Methoden entwickelt.

Eine dieser Methoden beruht auf **dominant-negativen Mutationen** in der bindenden Untereinheit des Toxins. Defektmutationen führen im Normalfall zur Synthese inaktiver Proteine. Gelegentlich entstehen durch die Mutationen jedoch auch Proteine, die nicht nur selbst inaktiv sind, sondern zudem auch die funktionsfähige Version des Proteins beeinträchtigen. Tritt eine solche Mutation in derselben Zelle auf wie die Wildtypversion des Gens (also im heterozygoten Zustand), so resultiert daraus eine Inaktivierung – daher die Bezeichnung *dominant-negativ*.

Diese Wirkung kommt in der Regel dadurch zustande, dass eine defekte Proteinuntereinheit an funktionsfähige Untereinheiten bindet und dadurch ein insgesamt inaktiver Komplex entsteht. Folglich betreffen die meisten dominant-negativen Mutationen Proteine aus mehreren Untereinheiten. Gute Beispiele hierfür sind die aus mehreren Untereinheiten bestehenden B-Proteine von A- und B-Toxinen wie Cholera toxin und Milzbrandtoxin. Von dem B-Protein (genauer: dem protektiven Antigen, PA) des Milzbrandtoxins hat man gezielt dominant-negative Mutationen isoliert. Wenn man die mutierten Untereinheiten mit aktiven vermischt, wurden daraus inaktive Heptamere zusammengebaut, welche zwar die Letal- oder Ödemfaktorproteine (also die A-Untereinheiten) binden, diese aber nicht in die Zielzellen transportieren können (Abb. 21.11). Durch Behandlung mit dominant-negativem PA-Protein konnte man sowohl menschliche Zellen in Kultur als auch lebende Mäuse oder Ratten vor dem Tod durch letale Dosen des Milzbrandtoxins bewahren.

Als weitere Methode kommt ein Phagen-Display infrage (s. Kap. 9), um nichtnatürliche Peptide zu isolieren, die an Bakterientoxine binden. Solche Peptide binden typischerweise eher schwach an einzelne Proteine. Sind jedoch mehrere Kopien des Peptids an ein flexibles Rückgrat gebunden, so erhält man einen sogenannten **polyvalenten Inhibitor**. Es kommt zur Bindung an mehrere Zielproteine, was zu einer



21.11 Dominant-negative Toxin-mutationen

Das PA63-Protein (protektives Antigen) bindet den Letalfaktor (LF) und den Ödemfaktor (EF) und transportiert diese mittels eines Endocytosevesikels in das Cytoplasma der Zielzelle. Die dominant-negative inhibitorische (DNI) Mutante des PA63-Proteins (violett) bildet zusammen mit normalen PA63-Monomeren (rosa) einen inaktiven Komplex, der die LF- und EF-Toxine nicht vom Vesikel ins Cytoplasma freisetzen kann.

enorm erhöhten Bindungsaffinität insgesamt führt. Damit dies funktioniert, muss das Ziel, wie bereits erläutert, ein Protein aus mehreren Untereinheiten sein – wie etwa das heptamere PA-Protein des Milzbrandtoxins. Mittels polyvalenter Peptidinhibitoren mit einem Polyacrylrückgrat konnte man Tiere erfolgreich vor dem Anthraxtoxin schützen.

Dominant-negative Mutationen der bindenden Untereinheiten von Toxinen können die Bindung normaler Toxine beeinträchtigen. Polyvalente Peptidinhibitoren erweisen sich für Toxine mit mehreren Rezeptor-bindenden Untereinheiten ebenfalls als wirkungsvoll.

► Weiterführende Literatur

- Arnold DL, Jackson RW, Waterfield NR, Mansfield JW (2007) Evolution of microbial virulence: The benefits of stress. *Trends Genet* 23: 293–300
- Baldari CT, Tonello F, Paccani SR, Montecucco C (2006) Anthrax toxins: A paradigm of bacterial immune suppression. *Trends Immunol* 27: 434–440
- Clarridge JE 3rd (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17: 840–862
- Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F (2006) Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367: 731–739
- Gal-Mor O, Finlay BB (2006) Pathogenicity islands: A molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8: 1707–1719
- Hung DT, Shakhnovich EA, Pierson E, Mekalanos JJ (2005) Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 310: 670–674
- Jolley KA, Brehony C, Maiden MC (2007) Molecular typing of meningococci: Recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev* 31: 89–96
- McLeod SM, Kimsey HH, Davis BM, Waldor MK (2005) CTX-phi and *Vibrio cholerae*: Exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship. *Mol Microbiol* 57: 347–356
- Miethke M, Marahiel MA (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 413–451
- Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckert A (2006) The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect* 8: 1915–1922
- Palomino JC (2006) Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 12: 172–178
- Shakhnovich EA, Hung DT, Pierson E, Lee K, Mekalanos JJ (2007) Virstatin inhibits dimerization of the transcriptional activator ToxT. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2372–2377
- Waldor MK, Friedman DI (2005) Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* 8: 459–465
- Yates SP, Jørgensen R, Andersen GR, Merrill AR (2006) Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. *Trends Biochem Sci* 31: 123–133

Virus- und Prion-Infektionen

Virusinfektionen und Wirkstoffe gegen Viren

Interferone steuern die Reaktion auf Viren

Das Influenzavirus ist ein Minusstrang-RNA-Virus

Das Retrovirus HIV, der Erreger von Aids

Chemokinrezeptoren fungieren als Corezeptoren für HIV

Behandlung von Aids

Infektiöse Prion-Krankheiten

Nachweis pathogener Prionen

Behandlungsmöglichkeiten für Prion-Krankheiten

Verwendung von Hefe-Prionen als Modelle

Weiterführende Literatur

Virusinfektionen und Wirkstoffe gegen Viren

Viele Krankheiten des Menschen werden durch Viren hervorgerufen. Über virale Infektionen ist bisher allerdings weniger bekannt als über bakterielle Krankheiten. Das liegt größtenteils daran, dass man Viren nicht alleine in Kultur züchten kann, weil sie von einer Wirtszelle abhängig sind. Bis vor nicht allzu langer Zeit standen im Kampf gegen Viren nur allgemeine Gesundheitsmaßnahmen und Impfungen zur Verfügung. Erst in letzter Zeit wurden in nennenswerter Anzahl spezielle Mittel gegen Viren entwickelt.

Pathogene Bakterien enthalten zahlreiche einzigartige Komponenten, die sich in eukaryotischen Zellen nicht finden und auf die man deshalb mit Antibiotika abzielen kann. Viren hingegen sind für fast alle ihre Stoffwechselreaktionen von der Wirtszelle abhängig und weisen – abgesehen von den Strukturproteinen – im Allgemeinen nur wenige einzigartige Bestandteile auf. Infolgedessen sind die meisten chemischen Wirkstoffe, die den Stoffwechsel von Viren beeinträchtigen, auch für die Wirtszellen toxisch.

Ähnlich den pathogenen Bakterien müssen sich auch Viren an ihre Wirtszellen anheften und in sie eindringen. Erkennungsproteine auf der Oberfläche des Viruscapsids binden an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle. Nach Eindringen in die Zelle replizieren sich die Viren auf Kosten der Wirtszelle. Diese liefert den Viren nicht nur Baustoffe und Energie, sondern stellt auch die zur Synthese der Virusproteine erforderlichen Riboso-

men zur Verfügung, darüber hinaus häufig auch noch viele der Enzyme, die zur Synthese der viralen Nucleinsäuren benötigt werden. Schließlich werden die neuen Viruspartikel zusammengebaut und verlassen die Wirtszelle. Die Stadien des viralen Entwicklungszyklus und die jeweils korrespondierenden antiviralen Wirkstoffe sind in Tabelle 22.1 aufgeführt. Die meisten modernen Mittel gegen Viren wurden zur Bekämpfung von HIV entwickelt und werden weiter unten in dem Abschnitt über Aids vorgestellt.

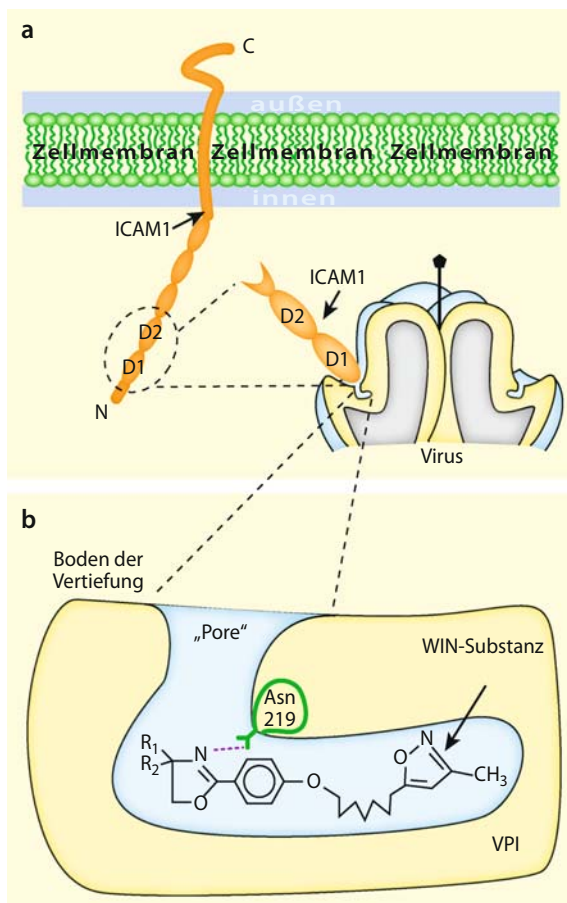
Grundsätzlich sollten lösliche Fragmente des Rezeptorproteins der Wirtszelle mit der Zelle um die Bindung der Viruspartikel in Konkurrenz treten; so ließe sich verhindern, dass diese an die Wirtszelle binden. Diese Möglichkeit (z.B. die Verwendung von CD4-Fragmenten für HIV) wird derzeit gerade erforscht. So verhindern beispielsweise **WIN-Substanzen** (benannt nach dem Pharmakonzern Sterling Winthrop pharmaceuticals) Anheftung und Eindringen vieler **Picornaviren**. Zu dieser Virusfamilie gehören die **Enteroviren** (z.B. das Poliovirus) und die **Rhinoviren** (eine der Virusgruppen, die einen gripalen Infekt hervorrufen). Viele dieser Viren binden an das Protein **ICAM-1** (engl. *intercellular adhesion molecule 1*; **interzelluläres Adhäsionsmolekül 1**) auf der Oberfläche tierischer Zellen. Dieses passt in eine Vertiefung (im Englischen spricht man bisweilen auch von einem „Canyon“) in der Hülle des Viruspartikels (Abb. 22.1). Am Grunde der Vertiefung befindet sich eine hydrophobe Tasche, die normalerweise ein Lipidmolekül enthält. WIN-Substanzen verdrängen dieses Lipid und verhindern Konformationsänderungen des Viruscapsidproteins VP1, die für die Bindung an den Rezeptor erforderlich sind.

Tabelle 22.1 Stadien des Entwicklungszyklus von Viren und die jeweiligen Antagonisten

Stadium des Entwicklungszyklus	mögliche antivirale Wirkstoffe
Bindung an den Rezeptor	lösliche Rezeptorfragmente, WIN-Substanzen (Picornavirus)
Eindringen in die Wirtszelle	Amantadin (Influenzavirus)
Genexpression	Interferon α und β
Reverse Transkription (nur Retroviren)	Inhibitoren der Reversen Transkriptase wie Nucleosidanaloga
Replikation	Nucleosidanaloga
Zusammenbau der Viruspartikel	Protease-Inhibitoren
Freisetzen der Viruspartikel	Neuraminidase-Inhibitoren (Influenzavirus)

Man kennt einige wenige antivirale Wirkstoffe, die ein Eindringen des Virus in die Wirtszelle verhindern, zum Beispiel Amantadin beim Influenzavirus (s. weiter unten).

Verglichen mit der Zahl der Antibiotika zur Behandlung bakterieller Infektionen stehen nur relativ wenige Wirkstoffe gegen Viren zur Verfügung. Hinzu kommt, dass die meisten dieser Wirkstoffe unerwünschte Nebenwirkungen haben.



22.1 WIN-Substanzen und das Picornaviruscapsid

a Picornaviren erlangen durch Bindung an die D1- und D2-Region von ICAM-1 Zutritt in eine Zelle. Die D1-Region bindet an eine Vertiefung („Canyon“) auf der Oberfläche des Virus. **b** WIN-Substanzen binden an die Lipidbindungsstelle unterhalb der Erkennungsstelle für ICAM-1. Sie binden fest an Asn 219, welches das Lipid verdrängt und verhindert, dass das Virusprotein VP1 an ICAM-1 bindet.

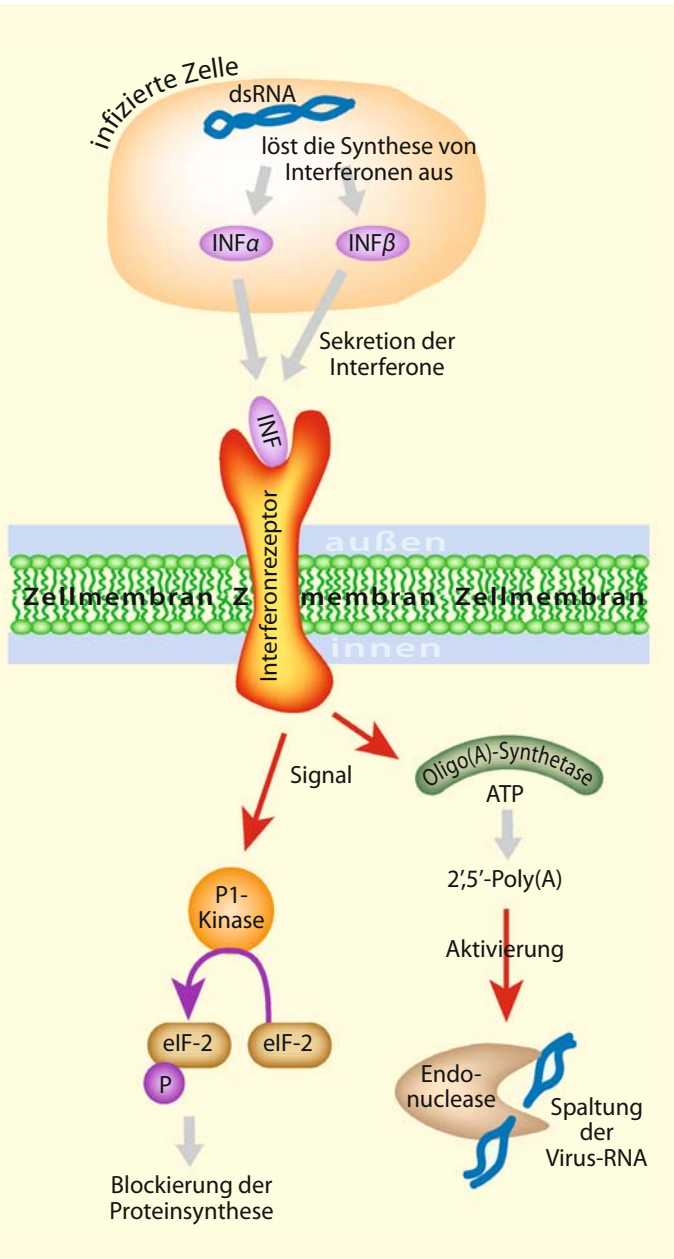
Interferone steuern die Reaktion auf Viren

Interferone sind eine Klasse von Proteinen, die in tierischen Zellen bei einer Virusinfektion produziert werden. In einigen wenigen Fällen werden Interferone auch zur klinischen Behandlung von Virusinfektionen eingesetzt. (z.B. gegen Hepatitis B und Hepatitis C). Die **Interferone α** und **β** (INF α und INF β) verhindern die Replikation der Viren und damit ihre Ausbreitung. (**Interferon γ** trägt zwar die gleiche Bezeichnung, unterscheidet sich aber ansonsten vollkommen; seine Bildung wird nicht durch eine Virusinfektion ausgelöst. Es erfüllt eine regulatorische Funktion als Reaktion auf intrazelluläre Pathogene.) Die Sezernierung der Interferone α und β wird ausgelöst durch doppelsträngige RNA, die typisch für die Replikation der meisten RNA-Viren ist. Sie binden an die Interferonrezeptoren der infizierten Zelle sowie an die ihrer Nachbarzellen. Dies löst lokal den Phosphorelay-Signaltransduktionsweg aus, der mehrere an der Bekämpfung von Virusinfektionen beteiligte Gene aktiviert (Abb. 22.2).

Zu den antiviralen Proteinen, deren Produktion durch Interferon ausgelöst wird, gehört Oligoadenylat-Synthetase, die ATP in 2'-5'-verknüpftes Poly(A) umwandelt. Dadurch wird das für die Replikation des Virus als Energiequelle benötigte ATP entfernt. Zusätzlich aktiviert 2'-5'-Poly(A) eine Endonuclease, die virale RNA spaltet. P1-Kinase wird ebenfalls aktiviert und phosphoryliert den Initiationsfaktor eIF-2, wodurch die Proteinsynthese zum Stillstand kommt. **Mx-Proteine** sind GTPasen, die vermutlich die RNA-Polymerasen von Minusstrang-RNA-Viren (wie Influenzavirus, Parainfluenzavirus) behindern. Interferone tragen auch zur Aktivierung der Zellen des Immunsystems bei, wie etwa NK-Zellen (Natural-Killer-Zellen), die selektiv mit Viren infizierte Zellen zerstören.

Interferon α war eines der ersten gentechnisch hergestellten Proteine von Säugetieren. Die damit erzielten klinischen Wirkungen erwiesen sich jedoch mit Ausnahme einiger weniger Fälle als enttäuschend. Bei den aktuellen Ansätzen zur antiviralen Therapie ist man von den Interferonen abgekommen und zielt eher auf eine Stimulation des RNA-Interferenz-Systems ab (s. Exkurs 22.1).

Interferone sind tierische Proteine, die eine Reaktion gegen Virusinfektionen aktivieren. Sie lösen die Synthese verschiedener Enzyme aus, die spezifisch gegen Viren wirken.



22.2 Interferone und antivirale Proteine

Durch das Vorhandensein von dsRNA in einer infizierten Zelle wird die Produktion von $\text{INF}\alpha$ und $\text{INF}\beta$ ausgelöst. Diese werden zu den benachbarten Zellen sezerniert, binden an den Interferonrezeptor und aktivieren verschiedene antivirale Proteine. P1-Kinase blockiert die Proteinsynthese durch Phosphorylierung von eIF-2 (einem Initiationsfaktor der Translation). Oligo(A)-Synthetase wandelt ATP in 2',5'-Poly(A) um; dieses aktiviert die Spaltung der dsRNA durch eine Endonuclease und braucht den Vorrat an ATP auf. Ohne ATP und Proteinsynthese kann das Virus in der Wirtszelle nicht überleben.

Exkurs 22.1

Virustherapie mittels RNA-Interferenz

Die Anzahl wirkungsvoller Wirkstoffe gegen Viren ist gering, die meisten davon haben zudem Nebenwirkungen. Als alternative Behandlungsmethoden wurden Antisense-RNA- und Ribozymtherapie vorgeschlagen, von denen sich aber bislang noch keine als effektiv erwiesen hat. Vielversprechend zur Behandlung von Virusinfektionen scheint jedoch die RNA-Interferenz (RNAi) zu sein.

Ausführlich behandelt wurde die RNA-Interferenz bereits in Kapitel 5. Durch RNAi schützen sich Wirtszellen vor dem Eindringen von RNA-Viren. Die RNAi zielt auf doppelsträngige RNA (dsRNA) ab, die bei der Replikation des RNA-Virus entsteht, und zerstört sowohl die dsRNA als auch die entsprechende einzelsträngige RNA (in der Praxis handelt es sich dabei gewöhnlich um virale mRNA). Wie zuvor beschrieben, wird RNAi durch kurze dsRNA-Moleküle aus etwas mehr als 20 Nucleotiden ausgelöst, die man als siRNA (für engl. *short* (oder auch *small*) *interfering RNA*) bezeichnet.

Es ist wenig überraschend, dass viele Viren Mechanismen entwickelt haben, um der Zerstörung durch RNAi zu entgehen. Bei Säugetieren kann man jedoch durch Verabreichen künstlich synthetisierter siRNA von rund 17 bis 21 Nucleotiden Länge eine starke RNAi-Reaktion auslösen, selbst gegen Viren mit starken Schutzmechanismen. Die Sequenz der siRNA repräsentiert konservierte Abschnitte des RNA-Virusgenoms.

Als besonders nützlich erweist sich eine RNAi-Therapie bei Viren, welche die Atemwege infizieren, denn man kann die siRNA leicht durch Inhalation verabreichen. Inzwischen werden RNAi-Methoden für Influenzavirus, Parainfluenzavirus und Respiratorisches Syncytial-Virus entwickelt. Die siRNA-Sequenzen können in Zellkultur auf ihre Effektivität analysiert werden, bevor man sie an lebenden Organismen anwendet. Wie Versuche mit Mäusen gezeigt haben, ergab sich ein guter Schutz gegen mehrere Viren der Atemwege. Mittlerweile befinden sich die klinischen Tests an Menschen für die Anwendung von siRNA gegen das Respiratorische Syncytial-Virus in der ersten Phase – mit bislang erfolversprechenden Ergebnissen.

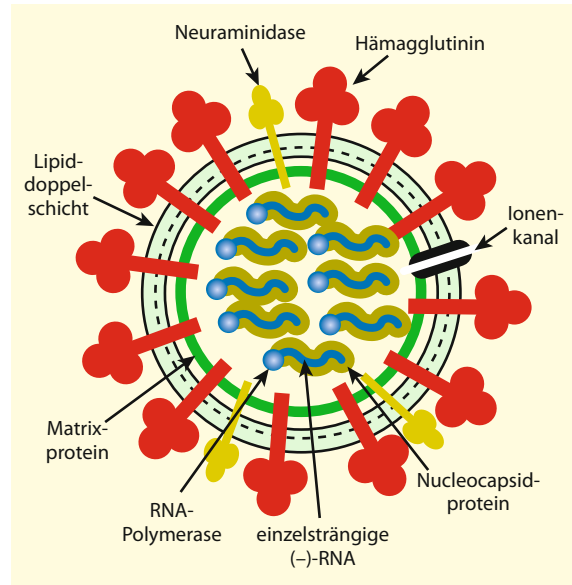
Das Influenzavirus ist ein Minusstrang-RNA-Virus

Das **Influenzavirus**, ein **Orthomyxovirus**, ist ein Beispiel für ein einzelsträngiges Minusstrang-RNA-Virus. Mit anderen Worten, das Virusgenom liegt in dem Viruspartikel in Form einer nichtcodierenden

RNA (= Antisense-RNA = Minusstrang) vor. Das Influenzaviruspartikel, der Erreger der Grippe, enthält ein segmentiertes Genom aus acht separaten einzelsträngigen RNA-Abschnitten von 890 bis 2341 Nucleotiden Länge. Diese sind jeweils in ein inneres **Nucleocapsid** verpackt und von einer äußeren Hülle umgeben (Abb. 22.3). Die äußere Membran besteht zwar aus Material der Wirtszelle, enthält aber vom Virusgenom codierte Proteine wie Neuraminidase, Hämagglutinin und Ionenkanäle. Diese Virusproteine werden an den Ribosomen infizierter Wirtszellen hergestellt und sind an der Viruserkennung und am Eindringen in weitere Wirtszellen beteiligt. Hämagglutinin und Neuraminidase unterscheiden sich bei verschiedenen Influenzastämmen jeweils leicht, aber nicht unerheblich. Diese Varianten werden jeweils mit H und N sowie mit Ziffern bezeichnet. Bei der Spanischen Grippe von 1918 handelte es sich beispielsweise um H1N1, die sich derzeit weltweit ausbreitende Vogelgrippe trägt die Bezeichnung H5N1.

Wenn ein Grippevirus mit einer geeigneten Wirtszelle in Kontakt kommt, wird es von der Zelle (durch Endocytose) aufgenommen und in einem Vesikel abgeschnürt. Anschließend werden das Vesikel und die Außenhülle des Viruspartikels aufgelöst und so die Nucleocapside freigesetzt, die in den Zellkern eindringen. Innerhalb des Zellkerns werden die Nucleocapside zerlegt und die RNA-Moleküle freigesetzt (Abb. 22.4). Die Replikation der Influenza-RNA erfolgt im Zellkern. Die virale mRNA verlässt dann den Zellkern genau wie eine normale zelluläre mRNA und wandert zu den Ribosomen im Cytoplasma. Hier werden die Proteine für die neuen Viruspartikel synthetisiert.

Da die Gene des Influenzavirus sich auf acht separate RNA-Moleküle verteilen, können verschiedene Influenzastämme RNA-Abschnitte untereinander austauschen und neue genetische Kombinationen bilden (Abb. 22.5). Zudem kommt es bei der Replikation von RNA mit höherer Rate zu Mutationen als bei DNA. Diese beiden Mechanismen führen zu einer enormen genetischen Variabilität. Folglich tauchen alle paar Jahre neue Grippevirusstämme auf. Durch ihre veränderten Oberflächenantigene entgehen die Viren der Erkennung durch das Immunsystem. Diese verschiedenen Influenzastämme unterscheiden sich erheblich in ihrer Virulenz. Dies beruht jedoch in gleichem Maße auf der Immungeschichte der menschlichen Bevölkerung wie auf genetischen Veränderungen des Virus.

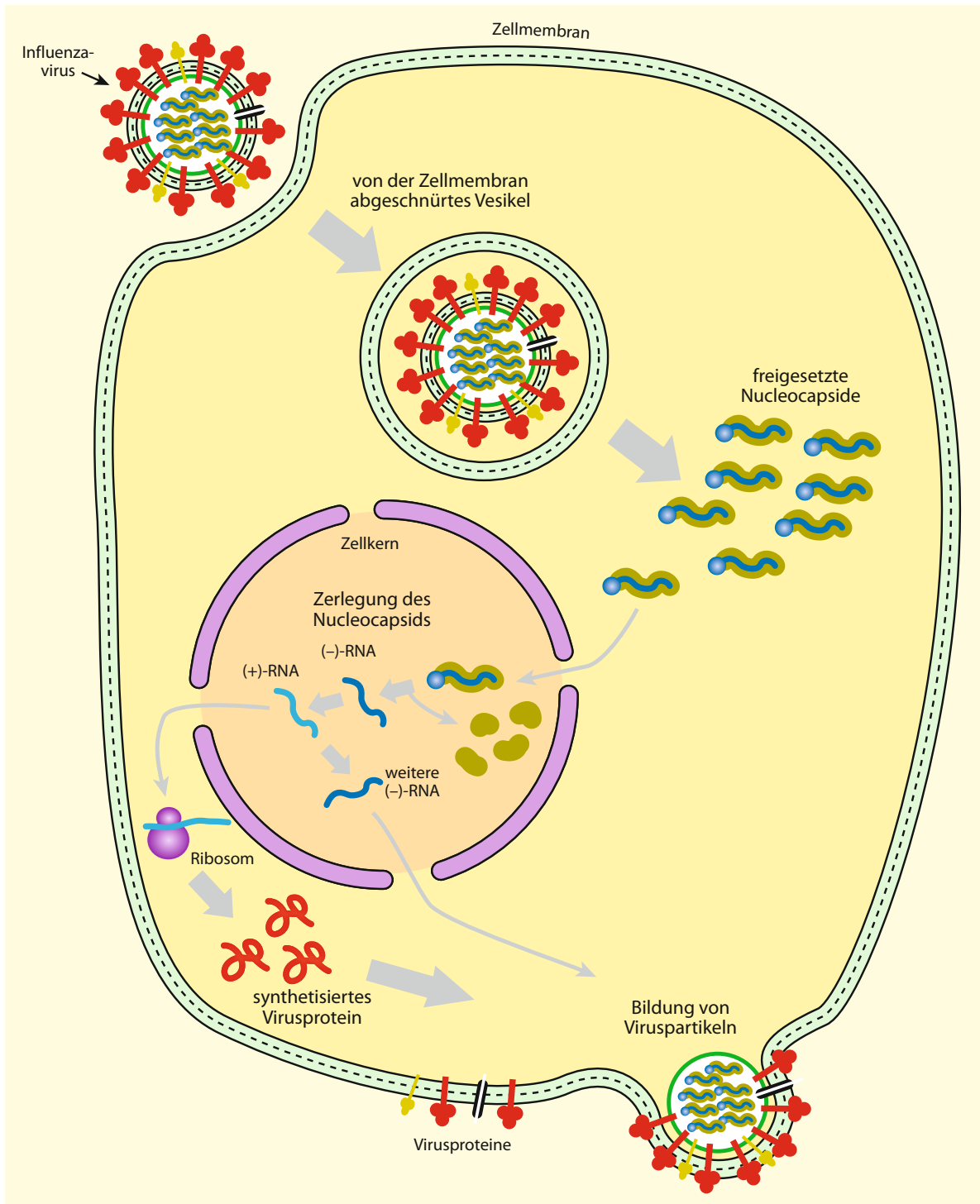


22.3 Aufbau des Influenzavirus

Die Außenhülle des Influenzavirus enthält Neuraminidase, Hämagglutinin und Ionenkanäle. Innerhalb der äußeren Membran sind mehrere einzelne Minusstrang-ssRNA-Moleküle gepackt. Jeder dieser Stränge ist von Nucleocapsidproteinen umhüllt. Für jeden ssRNA-Strang ist ein RNA-Replikase-Molekül enthalten und gewährleistet die Expression.

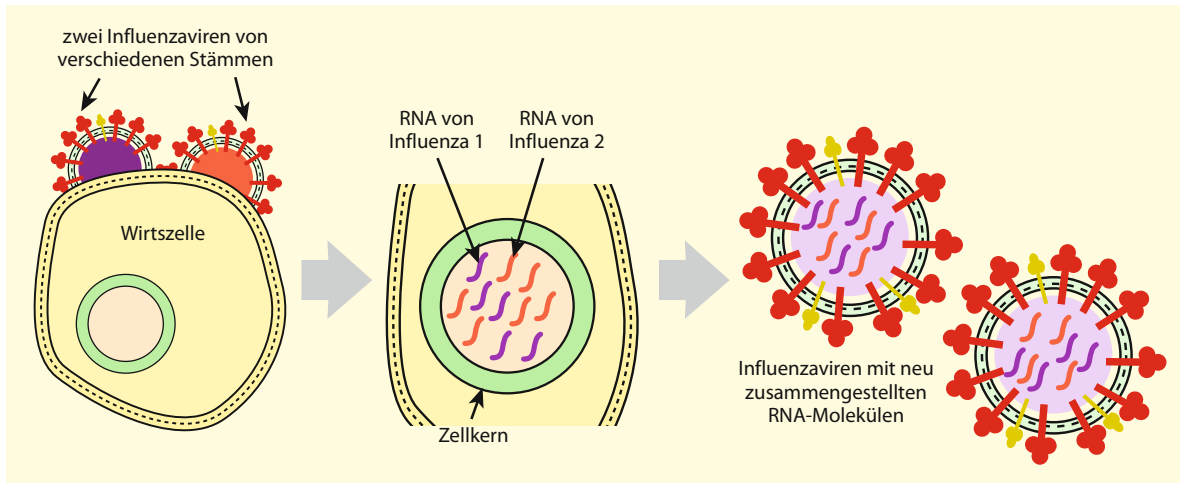
Influenzaviren lassen sich in die zwei Hauptgruppen Influenza A und B unterteilen. Durch Mutationen von A und B kommt es aufgrund der langsamen Antigendrift zu jährlichen Epidemien. Influenza B ist weitgehend auf den Menschen beschränkt und zeichnet sich durch eine geringere genetische Variabilität aus. Influenza A hat ein breiteres Wirtsspektrum (Menschen, Schweine und Geflügel). Deshalb verursacht Influenza A durch eine Neuzusammenstellung von Viren aus verschiedenen Wirten während gemischter Infektionen einige schlimme, aber weniger häufige Epidemien.

Die bisher schlimmste Influenza-A-Pandemie war die Spanische Grippe von 1918/1919; ihr sind schätzungsweise rund 50 Millionen Menschen zum Opfer gefallen (und damit mehr als im Ersten Weltkrieg). Wird es schon bald eine weitere große Grippepandemie geben? Die Weltgesundheitsorganisation WHO (World Health Organization) äußerte Bedenken wegen der ungewöhnlich ansteckenden, aus Asien stammenden Vogelgrippe (H5N1). Bislang haben sich schon einige Menschen an Vögeln angesteckt. Es besteht die große Gefahr, dass es zu



22.4 Entwicklungszyklus des Influenzavirus

Nach Eindringen in die Wirtszelle wandern die Nucleocapsids vor der Zerlegung in den Zellkern. Dort synthetisiert die virale Replikase (+)-RNA-Stränge und weitere (-)-RNA-Stränge. Die (+)-RNA-Stränge werden zu den Ribosomen exportiert, wo sie als mRNA fungieren und translatiert werden. Die entstehenden viralen Proteine werden dann zusammen mit den (-)-RNA-Strängen zu weiteren Viruspartikeln zusammengebaut.



22.5 Die Genome von Influenzaviren können RNA-Segmente austauschen

Infizieren zwei verschiedene Influenzastämme dieselbe Wirtszelle, so dringen beide Genome in den Zellkern ein. Bei der Bildung neuer Viruspartikel kann es vorkommen, dass einige Nucleocapside von Stamm 1 zusammen mit Stamm 2 verpackt werden und umgekehrt. Auf diese Weise können vollständige ssRNA-Moleküle von verschiedenen Influenzastämmen neu gemischt werden und neue Zusammenstellungen ergeben. Bei Schweinen und Vögeln kommt es häufiger zu einer solchen Vermischung als beim Menschen.

einer weiteren Mutation kommt, durch die das Virus problemlos von Mensch zu Mensch übertragen werden kann.

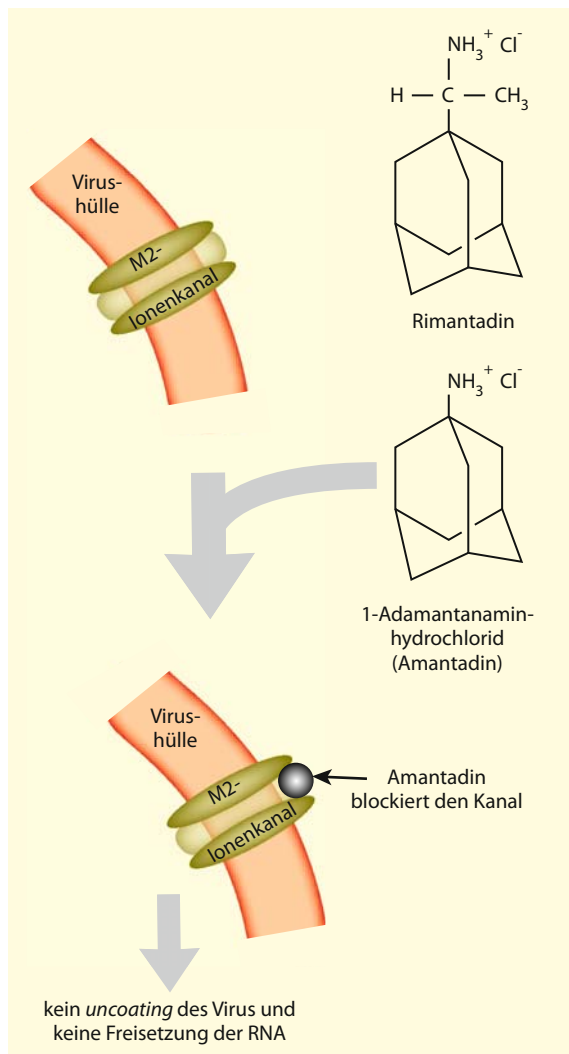
Amantadin ist ein trizyklisches Amin, das an das M2-Protein bindet, einen der membrandurchspannenden Ionenkanäle in der Außenhülle des Influenza-A-Virus. Von Influenza B wird M2 nicht exprimiert, deshalb wirkt Amantadin nur gegen Influenzaviren vom Stamm A. Amantadin blockiert den M2-Ionenkanal und somit den Eintritt von Protonen; auf diese Weise wird das sogenannte *uncoating* des Viruspartikels, das Freisetzen des Genoms aus CapSID und Virushülle, verhindert (Abb. 22.6) und damit das Eindringen des Virus. Amantadin muss bei einer Infektion sehr früh verabreicht werden. Es wurde als erster spezifischer und effektiver Wirkstoff gegen Viren entdeckt, seine Wirkungsweise wurde jedoch erst vor kurzem geklärt.

Influenzaviren (vom Typ A oder B) können auch mit Neuraminidase-Inhibitoren wie Oseltamivir (= Tamiflu) oder Zanamivir behandelt werden. Dabei handelt es sich um Analoga von N-Acetylneuraminsäure. Normalerweise spaltet Neuraminidase diese vom Virusrezeptor ab und ermöglicht so die Freisetzung der nächsten Generation von Viruspartikeln. Wird Neuraminidase inhibiert, bleiben die Virennachkommen in den infizierten Zellen gefangen.

Grippe ist eine extrem häufige Virusinfektion des Menschen und einiger Tiere. Das Genom des Influenzavirus besteht aus acht RNA-Abschnitten mit negativer Komplementarität ((-)RNA-Strängen). Infolgedessen ist es durch eine hohe Mutations- und Rekombinationsrate gekennzeichnet. Zur Behandlung von Influenzainfektionen stehen nur wenige Medikamente zur Verfügung.

Das Retrovirus HIV, der Erreger von Aids

Aids (für engl. *acquired immunodeficiency syndrome*; erworbenes Immunschwächesyndrom) wird durch das **humane Immundefizienzvirus (HIV)** hervorgerufen, welches das Immunsystem schädigt. Die meisten Aidspatienten sterben an **opportunistischen Infektionen**. Solche Infektionen treten nur bei Patienten mit geschädigtem Immunsystem auf und werden von verschiedenen Viren, Bakterien, Protozoen und Pilzen hervorgerufen, die normalerweise relativ harmlos sind. Diese nehmen aber die Gelegenheit zu einem Angriff wahr, wenn das Abwehrsystem des

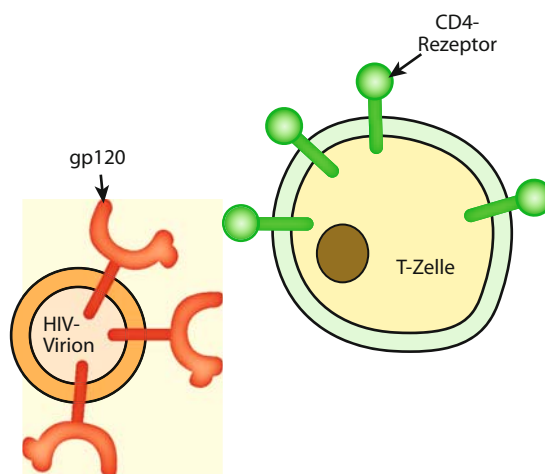


22.6 Amantadin blockiert den M2-Ionenkanal

Das Amantadinmolekül verhindert das Einströmen von Ionen durch den M2-Kanal in der Virushülle und verhindert so das *uncoating* und die Freisetzung des RNA-Moleküls.

Wirtes geschwächt ist. Ohne Immunüberwachung kommt es häufig dazu, dass von anderen Viren verursachte Krebserkrankungen oder somatische Mutationen außer Kontrolle geraten.

HIV infiziert im Blut zirkulierende weiße Blutkörperchen, die der Immunabwehr dienen, die **T-Zellen** oder T-Lymphocyten. Auf der Oberfläche vieler T-Zellen findet sich das Protein **CD4**; es fungiert dort als wichtiger Immunrezeptor bei der Immunantwort (s. Kap. 6). HIV nutzt ebenfalls CD4 als Rezeptor (Abb. 22.7). Das Protein **gp120** in der äußeren Virus-

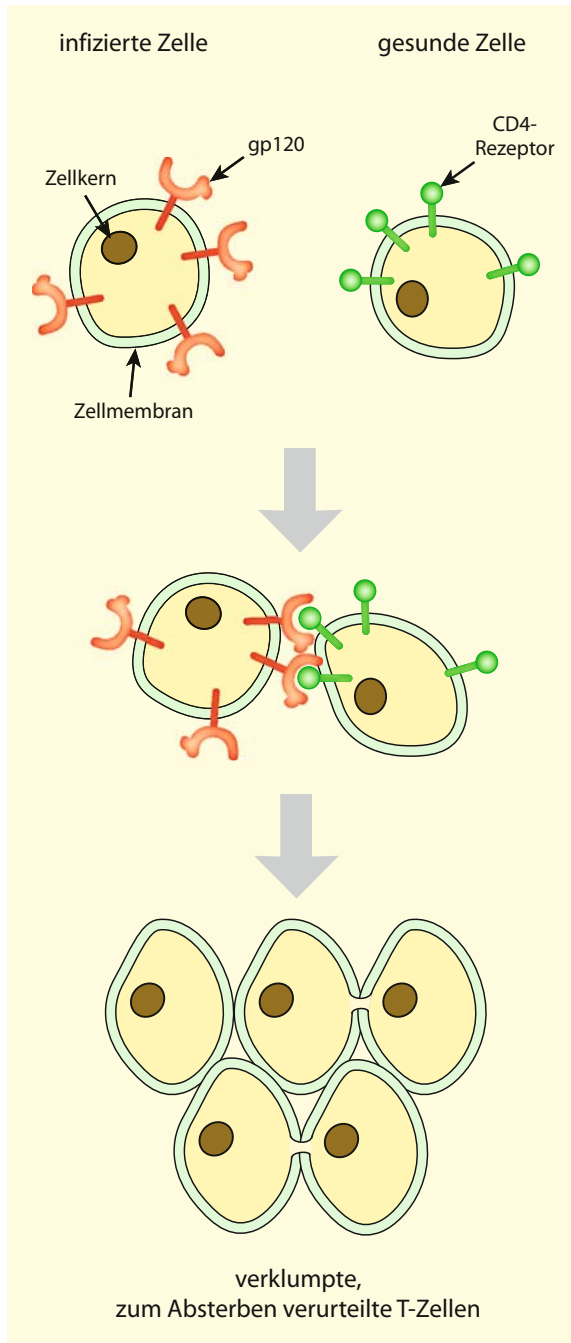


22.7 HIV nutzt das Protein CD4 als Rezeptor

HIV-Partikel sind von dem Glykoprotein gp120 umhüllt, welches die T-Zellen des Immunsystems erkennt. Das virale gp120 bindet an das Protein CD4 auf der Oberfläche der T-Zelle. Daraufhin wird das Viruspartikel in die T-Zelle aufgenommen und macht sich die Zellmaschinerie zur Produktion weiterer Viruspartikel zunutze.

hülle von HIV ist ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 120 kDa. Es erkennt und bindet an CD4, was für das Eindringen des Virus erforderlich ist.

Das CD-Protein findet sich auch auf der Oberfläche einiger anderer Zellen des Immunsystems, den Monocyten und Makrophagen. HIV schädigt diese beiden Zelltypen nicht ernsthaft, aber die Zellen werden dadurch zu Reservoiren, um das Virus über weitere T-Zellen zu verbreiten. Die Schädigung der T-Zellen ist am kritischsten für die Funktion des Immunsystems. Ist HIV erst einmal in die T-Zelle eingedrungen, baut sich die DNA-Form des Retrovirusgenoms in das Wirtschromosom ein und beginnt, Virusgene zu exprimieren. An den Ribosomen des Wirtes werden virale Proteine synthetisiert. Insbesondere gp120 wird in großen Mengen produziert und in die Membran der Wirtszelle eingebaut. Infolgedessen tragen infizierte T-Zellen das gp120-Protein des HIV-Partikels an ihrer Oberfläche. Diese bindet an das CD4-Protein anderer T-Zellen. Das hat zur Folge, dass mehrere T-Zellen verklumpen und miteinander fusionieren (Abb. 22.8). Die riesige Mehrfachzelle stirbt bald ab. Ungefähr 70 % der T-Zellen des Körpers tragen den CD4-Rezeptor. Wenn sie nach und nach absterben, schwächt sich die Immunantwort im Laufe von fünf bis zehn Jahren immer mehr ab.



22.8 Fusion infizierter T-Zellen

Nach dem Eindringen von HIV in die T-Zelle werden große Mengen von gp120 synthetisiert und in die Membran der Wirtszelle eingebaut. T-Zellen mit gp120 in der Membran binden über den CD4-Rezeptor an andere T-Zellen, die daraufhin miteinander verschmelzen. Dies setzt sich so lange fort, bis sich große Klumpen von T-Zellen gebildet haben. Diese sterben bald ab und schwächen das Immunsystem.

Aids wird durch ein Retrovirus hervorgerufen, welches das CD4-Protein auf der Oberfläche von T-Zellen als Rezeptor nutzt. Durch Beschädigung der T-Zellen kommt es zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems, und der Körper wird anfälliger für andere Infektionen.

Chemokinrezeptoren fungieren als Corezeptoren für HIV

Damit HIV in T-Zellen eindringen kann, muss das Virus sowohl an den CD4-Rezeptor als auch an einen von mehreren Chemokinrezeptoren binden, die als **Corezeptoren** fungieren. Bei den **Chemokinrezeptoren** handelt es sich um Membranproteine mit sieben Transmembransegmenten. Sie binden **Chemokine**, eine Gruppe von ungefähr 50 kleinen Botenpeptiden, welche die weißen Blutkörperchen des Immunsystems aktivieren und zur Stelle der Infektion locken. Die wichtigsten Chemokinrezeptoren für das Eindringen von HIV sind **CCR5** und in geringerem Umfang CXCR4.

Ein kleiner Teil der Bevölkerung ist von Natur aus resistent gegen eine Infektion durch das Aidsvirus; dafür sind größtenteils Mutationen von CCR5 verantwortlich. Das **CCR5 Δ 32**-Allel weist eine Deletion von 32 Basenpaaren auf und führt zur Synthese eines nicht funktionsfähigen CCR5-Proteins. Für CCR5 Δ 32 homozygote Individuen sind weitaus weniger anfällig für eine HIV-Infektion (obgleich nicht völlig resistent). Ist eine solche Person infiziert, schreitet die Krankheit sehr viel langsamer voran. Etwa 2 % aller Europäer sind homozygot und 14 % heterozygot für CCR5 Δ 32. Heterozygote scheinen mäßig geschützt und zeigen einen langsameren Krankheitsverlauf, aufgrund geringerer Mengen des CCR5-Proteins auf der Oberfläche ihrer T-Zellen. Entstanden ist das CCR5 Δ 32-Allel einer Datierung zufolge vor rund 700 Jahren zur Zeit des „Schwarzen Todes“ in Nordwesteuropa. Vielleicht wurden die Defekte an CCR5 selektioniert, weil sie eine Resistenz gegen die Pest vermittelten. Eine unterschiedliche Anfälligkeit gegen Aids ergibt sich auch aus Veränderungen der DNA-Sequenz für den Promotor des CCR5-Gens. Vermutlich sorgen diese dafür, dass unterschiedliche Mengen CCR5-Protein synthetisiert werden.

Bereits vorhandene Rezeptoren, welche die Aufnahme wichtiger Moleküle in tierische Zellen steuern, bilden häufig Ziele für Viren. Es ist durchaus möglich, dass dasselbe Wirtszellprotein von nicht miteinander verwandten infektiösen Erregern – ob Viren oder Bakterien – als Rezeptor verwendet wird. Das Myxomatosevirus, das bei Kaninchen eine Immunschwäche hervorruft, nutzt ebenfalls CCR5- und CXCR4-Chemokinrezeptoren. Welche Rezeptoren vom Pockenvirus des Menschen und anderen verwandten Pockenviren verwendet werden, ist noch nicht bekannt. Andere Pathogene, darunter der Malariaerreger, zielen ebenfalls auf Chemokinrezeptoren ab, allerdings nicht auf CCR5 und CXCR4. Derzeit versuchen Wissenschaftler herauszufinden, welche Funktionen verschiedene Rezeptoren auf Immunzellen erfüllen. Dadurch erhofft man sich, besser zu verstehen, wie Viren diese zu ihrem eigenen Vorteil nutzen.

Für das Eindringen von HIV in seine Zielzellen sind Corezeptoren erforderlich. Die natürliche Resistenz gegen Aids entsteht durch Defekte der Corezeptoren, vor allem des CCR5-Chemokinrezeptors.

Behandlung von Aids

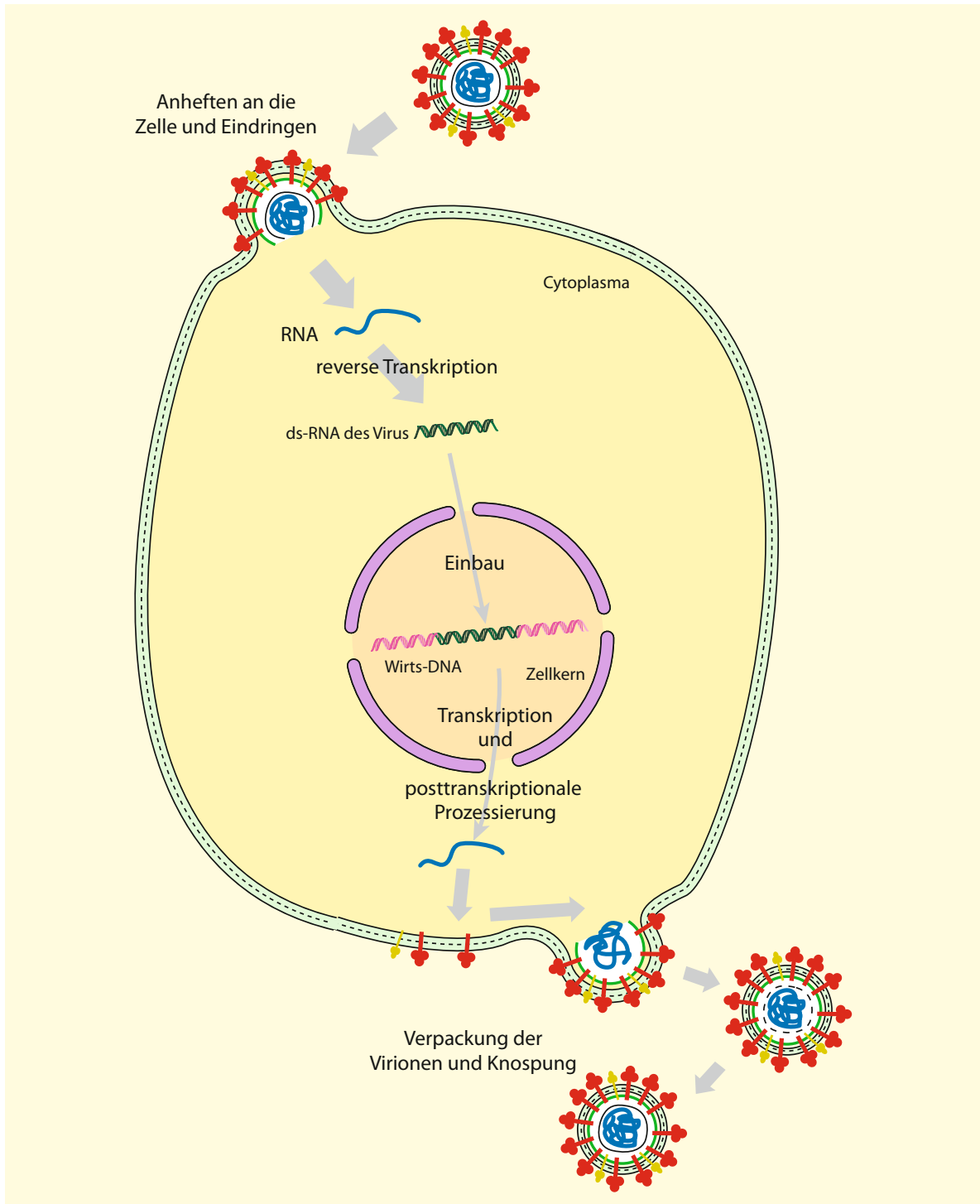
Vor einiger Zeit hat Aids Malaria bei den Infektionskrankheiten weltweit als Haupttodesursache abgelöst. Bislang ist Aids noch nicht vollständig heilbar, und es gibt noch keinen wirkungsvollen Impfstoff. Durch verschiedene Behandlungsmöglichkeiten lässt sich das Leben der Patienten jedoch deutlich verlängern. Als grundlegendes Problem bei allen Medikamenten gegen Aids erweist sich, dass HIV ein RNA-Virus ist und somit eine relativ hohe Mutationsrate aufweist. HIV mutiert mit einer Rate von ungefähr einer Base pro Genom und Replikationszyklus. Selbst innerhalb eines Patienten liegt HIV als Schwarm nahe verwandter Varianten vor, die man als **Quasispezies** bezeichnet. Daher tauchen relativ häufig gegen einzelne Medikamente resistente HIV-Stämme auf. Bei allen Versuchen zur Bekämpfung von Aids (Abb. 22.9) – ob durch Impfstoffe, Inhibitoren der Proteinprozessierung oder Antisense-RNA – stellt sich das gleiche Problem: HIV mutiert und produziert resistente Varianten. Durch gleichzeitige Behandlung mit mehreren Medikamenten, die auf verschiedene Ziele

einwirken, lässt sich dieses Problem teilweise in den Griff bekommen.

Eines der ersten gegen Aids eingesetzten Medikamente war **Azidothymidin (AZT, oder Zidovudin)**, ein Analogon von Thymidin, dem die 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Daneben werden verschiedene andere **Nucleosidanaloga** verwendet, denen die 3'-Hydroxylgruppe ebenfalls fehlt. AZT und andere 3'-Desoxy-Basenanaloga werden von der Zelle in das 5'-Triphosphat umgewandelt und anschließend während der reversen Transkription in die wachsende DNA-Kette eingebaut (Abb. 22.10). Da AZT keine 3'-Hydroxylgruppe aufweist, kann die DNA-Kette nicht verlängert werden. AZT wirkt also als **DNA-Ketten-Terminator**. Auch wenn AZT von der viralen Reversen Transkriptase eher eingebaut wird als von den meisten Wirtszell-DNA-Polymerasen, ist es nicht völlig spezifisch. Als wesentlicher Nachteil erweist sich, dass AZT die Synthese der Wirts-DNA in nicht infizierten Körperzellen teilweise inhibiert. Insbesondere auf Knochenmarkszellen (B-Zellen), die ebenfalls Bestandteil des Immunsystems sind, hat es eine toxische Wirkung. Mutationen der Reversen Transkriptase von HIV können zu einer Resistenz gegen Basenanaloga führen. So erhöht beispielsweise Met41Leu (d.h. der Austausch von Methionin an Position 41 gegen Leucin) die Resistenz gegenüber AZT um das Vierfache, und eine zweite Mutation von Thr215Tyr ergibt eine 70-fach erhöhte Resistenz.

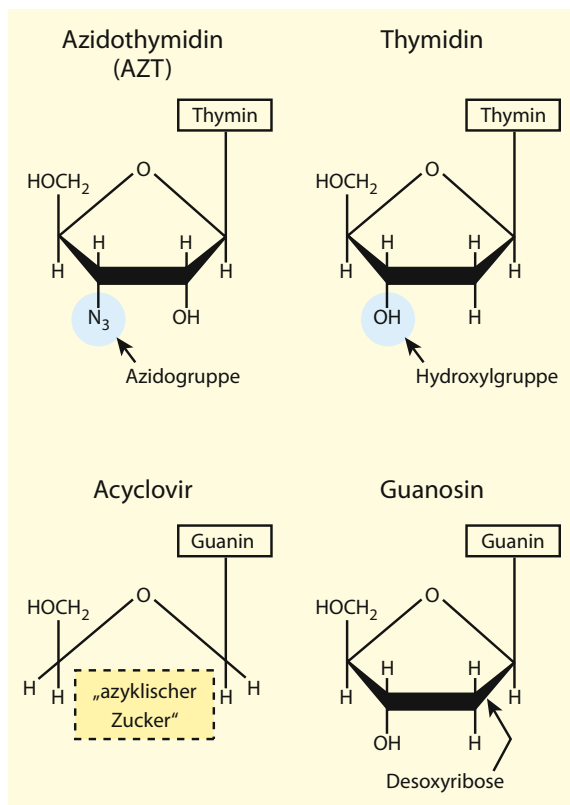
Bestimmte Medikamente, die nicht am aktiven Zentrum binden, können die Reverse Transkriptase ebenfalls inhibieren. Man bezeichnet sie als **nicht-nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI; Abb. 22.11)**. Sie binden an einer anderen Stelle, relativ nahe am aktiven Zentrum, an das Enzym. Dadurch wird die Struktur der Reversen Transkriptase verändert und ihre Aktivität unterbunden. Leider kommen Mutationen, welche die NNRTI-Bindungsstelle verändern, recht häufig vor, weshalb resistente Reverse-Transkriptase-Enzyme entstehen. Daher werden diese Medikamente im Allgemeinen in Kombination mit Nucleosidanaloga eingesetzt.

Die meisten einzelnen HIV-Proteine werden bei ihrer Synthese zu Polyproteinen verbunden und müssen daher zunächst von der HIV-Protease auseinandergeschnitten werden. So entsteht beispielsweise bei der Transkription und Translation des *env*-Gens gp160, das in gp41 und gp120 gespalten wird. Das *gag*-Gen codiert für ein Polyprotein, das die Proteine der Virushülle umfasst. Folglich ließe sich durch eine Hemmung der Polyproteinspaltung der Zusammenbau der Viruspartikel verhindern. Die HIV-Protease



22.9 Mögliche Schritte der Hemmung von HIV

HIV-Infektionen könnten an den folgenden Schritten unterbunden werden: 1) An der Zelloberfläche könnten konkurrierende Moleküle ein Anheften der Viren verhindern. 2) Enzyminhibitoren könnten die Wirkung der Reversen Transkriptase blockieren. 3) Man könnte den Einbau des Virusgenoms verhindern. 4) Verhinderung der Transkription und Translation. 5) Würde das Verpacken und Knospen der Virionen verhindert, so würde dies andere Zellen vor Infektionen schützen.

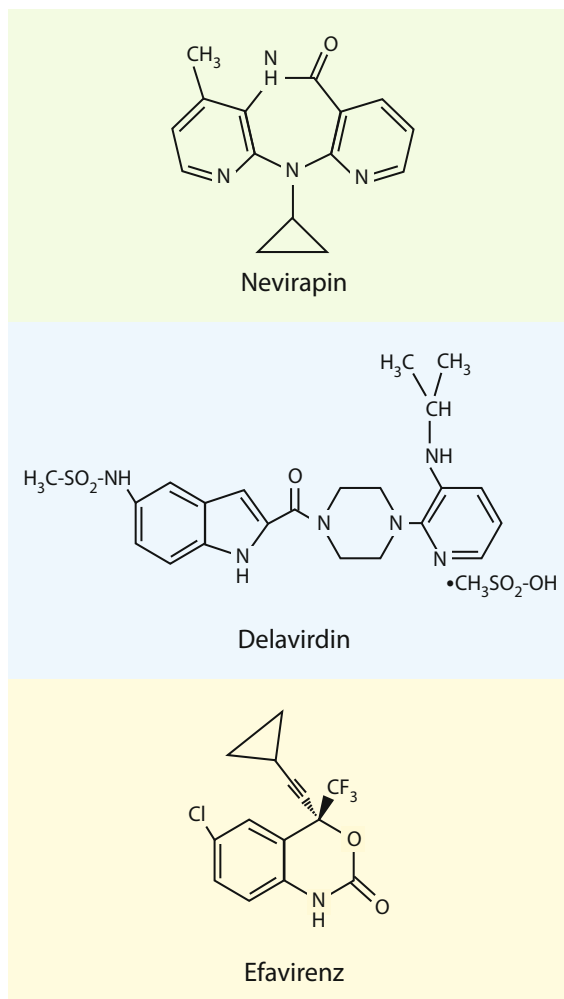


22.10 Nucleosidanaloga wirken als Kettenterminatoren

Zwei Beispiele für Kettenterminatoren sind Azidothymidin (AZT) und Acyclovir, die Thymin beziehungsweise Guanin ersetzen. Bei AZT befindet sich an der 3'-Position des Desoxyriboseringes statt einer Hydroxylgruppe eine Azidogruppe. Bei Acyclovir ist der gesamte Desoxyribosering verändert. In beiden Fällen werden die Analoga während der von der Reversen Transkriptase vermittelten Reaktion in die DNA eingebaut. Nach Einbau des Analogons kann die Reverse Transkriptase die DNA-Kette nicht mehr weiter verlängern, weil den Analoga die 3'-OH-Gruppe fehlt, an die das nächste Nucleotid angefügt würde.

erkennt und bindet einen Abschnitt aus sieben Aminosäuren in der Umgebung der Spaltungsstelle. Dieser Schritt kann durch **Protease-Inhibitoren** (auch Proteinase-Inhibitoren) blockiert werden – Analoga mehrerer Aminosäuren in der Nähe der Spaltstelle (Abb. 22.12). Saquinavir ist zum Beispiel ein Analogon von Asn-Tyr-Pro.

Gegenwärtig favorisiert man in der Aidstherapie den Ansatz, drei Medikamente mit unterschiedlichen Wirkmechanismen in Kombination einzusetzen. Dabei ist zu beachten, dass die verschiedenen Medi-

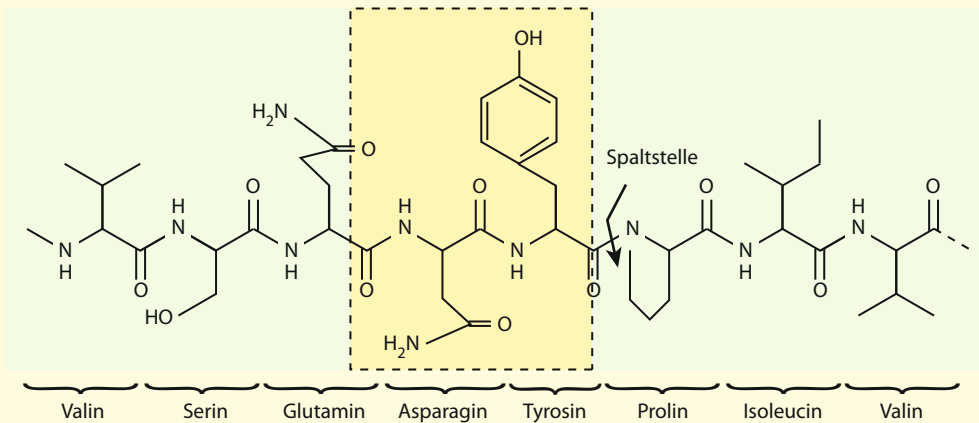


22.11 Nichtnucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

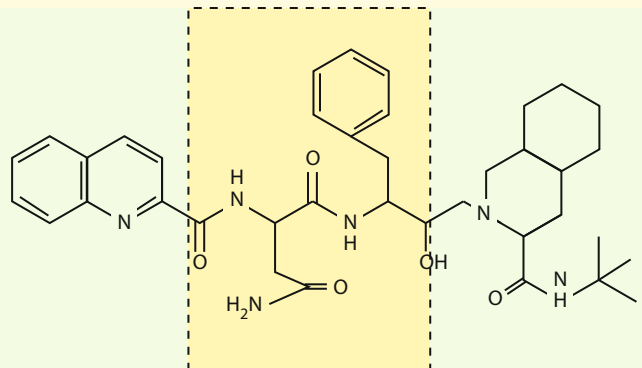
Die chemische Struktur von drei NNRTIs, die derzeit in Verwendung sind: Nevirapin, Delavirdin und Efavirenz. Sie wirken spezifisch auf HIV-1, erzielen jedoch keine Wirkung bei HIV-2.

kamente *nicht* nacheinander eingenommen werden, weil sich dann gegen jedes Medikament Resistenzen entwickeln können. Erfolgt die Verabreichung der drei Präparate jedoch gleichzeitig, so werden eventuell auftauchende Virusmutanten, die gegen eines der Medikamente resistent sind, durch die anderen abgetötet. Ein typischer Medikamentencocktail besteht beispielsweise aus einem Reverse-Transkriptase-Inhibitor, Hydroxyharnstoff und einem Protease-Inhibitor. Seit dem Jahr 1995, seit Protease-Inhibitoren zur Verfügung stehen, sind die Sterbefälle infolge von Aids

a natürliche Substrate von HIV-1-Protease



b Protease-Inhibitor Saquinavir

**Abb. 22.12 Protease-Inhibitoren**

a HIV-1-Protease erkennt Asn-Tyr-Pro und spaltet das Protein zwischen dem Tyrosin- und dem Prolinrest. **b** Die Struktur von Saquinavir ahmt diese drei Aminosäuren nach. HIV-1-Protease bindet an Saquinavir, kann es aber nicht spalten oder freisetzen, weil die Spaltungsstelle fehlt.

in Ländern, deren Einwohner sich eine kostspielige Langzeitbehandlung mit teuren Arzneimitteln leisten können, um 50–80 % gesunken. Im Jahr 2000 erhielt etwa ein Drittel der HIV-positiven Amerikaner eine Behandlung, 80 % davon in Form eines Cocktails, der Protease-Inhibitoren enthielt. In den Vereinigten Staaten entstehen durch die Behandlung mit solchen Cocktails monatliche Kosten von 800 bis 1500 Dollar, allerdings sinken diese Kosten nach und nach.

Zu den entscheidendsten Kniffen bei der Zusammenstellung dieser Cocktails zählt, dass sie auch Hydroxyharnstoff enthalten. Hydroxyharnstoff inhibiert Enzyme der menschlichen Wirtszelle, die das Aidsvirus für seine Replikation benötigt. Weil menschliche

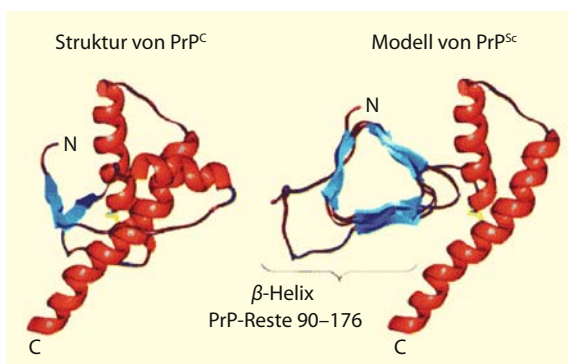
Gene für diese Proteine codieren, kann das Virus nicht mutieren und Hydroxyharnstoff-resistente Enzyme bilden. Während sich dies als vorteilhaft erweist, stellt sich bei Hydroxyharnstoff aber das Problem, dass er die menschliche DNA-Replikation hemmt. Daher kann man ihn nicht in so hohen Dosen verabreichen, dass die *gesamte* DNA-Replikation unterbunden wird.

In jüngster Zeit entwickelte antivirale Wirkstoffe richteten sich gegen Aidsviren. Hierzu zählen Nucleosidanaloga (Kettenterminatoren), nichtnucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren und Protease-Inhibitoren.

Infektiöse Prion-Krankheiten

Prionen sind Proteine mit einzigartigen Eigenschaften. Sie können erbliche, spontan auftretende oder infektiöse Krankheiten auslösen. Das **Prion-Protein (PrP)** liegt in zwei Konformationen vor, in der normalen, harmlosen „zellulären“ Form (**PrP^C**) und in der pathogenen Form (**PrP^{Sc}**) – benannt nach Scrapie, der Traberkrankheit von Schafen (Abb. 22.13). Abnorme Prion-Proteine binden an ihre normalen Verwandten und bewirken eine Konformationsänderung in die pathogene Form. Schon eine kleine Zahl falsch gefalteter Proteine kann somit die Population normaler Proteine zerrütten. Dies führt mit der Zeit zur Degeneration von Nervenzellen und schließlich zum Tod.

Durch Mutationen innerhalb des **Prnp-Gens**, das für das Prion-Protein codiert, können Prionen mit einer stark erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine fehlerhafte Faltung entstehen. Dadurch werden erbliche Prion-Krankheiten hervorgerufen. Man kennt mehrere klinisch abweichende Varianten, je nach genauer Lokalisation der Mutation innerhalb des Prion-Proteins und der Art des Aminosäureaustauschs. Am häufigsten tritt die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) auf. Selbst bei normalen Prionen kommt es gelegentlich zu einer fehlerhaften Faltung. Dadurch entstehen spontane Prion-Krankheiten – in der menschlichen Bevölkerung geschieht das mit einer Rate von ungefähr eins zu einer Million.



22.13 Normale und pathogene Formen des Prion-Proteins

Die Struktur von PrP^C ist links, die von PrP^{Sc} rechts dargestellt. Auffällig ist der stark erhöhte Anteil an β -Faltblättern in der PrP^{Sc}-Struktur. Aus Eghiaian (2005). Structuring the puzzle of prion propagation. *Curr Opin Struct Biol* 15: 724–730. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung.

Werden die Prionen mit der abnormen Konformation auf einen anderen empfänglichen Wirt übertragen, so ruft diese eine infektiöse Prion-Krankheit hervor, man spricht von der **Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathie (TSE)**. Eine solche Infektion kann durch Eindringen der PrP^{Sc}-Form des Prions von Zelle zu Zelle und von Tier zu Tier übertragen werden, wobei die Tiere der gleichen Art oder auch verschiedenen Arten angehören können. Neue Opfer können sich nur unter bestimmten Voraussetzungen mit Prionen infizieren. Sie müssen dazu abnorme Prion-Proteine von infiziertem Nervengewebe – insbesondere aus dem Gehirn – aufnehmen. Wie die Infektion genau vonstatten geht, ist noch unklar. Zu den bekanntesten Prion-Krankheiten zählen:

1. **Scrapie (Traberkrankheit)**, eine Krankheit von Schafen und Ziegen;
2. **Kuru**, eine bei Kannibalen auftretende Krankheit;
3. **Rinderwahnsinn**, offiziell als **Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)** bezeichnet;
4. **Chronic Wasting Disease (CWD)** von Rotwild. Anders als die anderen TSEs kann diese offenbar über den Speichel übertragen werden.

Für die Krankheit Scrapie, von der Schafe und ihre Verwandten befallen werden, gibt es aus Europa schon mehrere Hundert Jahre alte Belege. Der englische Name dieser Krankheit leitet sich von dem Verhalten infizierter Schafe ab, die sich ständig an Zäunen, Bäumen oder Wänden scheuern (engl. *to scrape*) und sich dabei häufig ernsthafte Verletzungen zuziehen. Nur bestimmte Schafsrassen sind empfindlich für diese Krankheit, denn die Rassen weisen geringe Unterschiede in den Prion-Sequenzen auf. Durch verwesende Kadaver von Schafen können Prion-Proteine auf das Weideland gelangen. Auf diese Weise können die in der Regel stabilen und langlebigen Prion-Proteine von gesunden Schafen beim Grasens aufgenommen werden.

Die Krankheit Kuru trat ausschließlich beim Stamm der Fore in Neuguinea auf und wurde durch rituellen Kannibalismus übertragen. Den Frauen wurde die Ehre zuteil, die Gehirne verstorbener Verwandter zuzubereiten und an deren rituellem Verzehr teilzuhaben. Infolgedessen waren 90 % der Opfer Frauen und die sie begleitenden Kleinkinder. Bis zum Auftreten der Symptome konnten zehn bis 20 Jahre vergehen; danach führte der Krankheitsverlauf aber über Kopfschmerzen und Unsicherheiten beim Gehen innerhalb von ein bis zwei Jahren zum

Tod durch Absterben von Nervenzellen. Seit 1959 der Kannibalismus eingestellt wurde, hat keiner der danach geborenen Stammesangehörigen mehr Kuru bekommen.

Die als Spongiforme Enzephalopathie bezeichneten schwammartigen Veränderungen des Gehirns, die auf Prionen mit abnormer Konformation zurückzuführen sind, können bei allen Säugetierarten auftreten. Neben Scrapie, BSE und CWD sind bei anderen Tieren auch noch weitere Prion-Krankheiten bekannt, über die man jedoch noch weniger weiß. Im Grunde handelt es sich immer um die gleiche Krankheit, denn es gibt nur ein einzelnes Prion-Gen, das für ein einzelnes Prion-Protein codiert, welches im Gehirn aller Säugetiere vorkommt. Die Symptome variieren etwas von Art zu Art. Nach einer längeren Inkubationszeit kommt es schließlich zur Degeneration und zum Absterben von Zellen des Zentralnervensystems. Wie der populäre Name *Rinderwahnsinn* schon andeutet, führt die fortschreitende Degeneration des Gehirns und des übrigen Nervensystems dazu, dass sich die infizierten Tiere in den späteren Stadien der Krankheit sehr eigenartig verhalten.

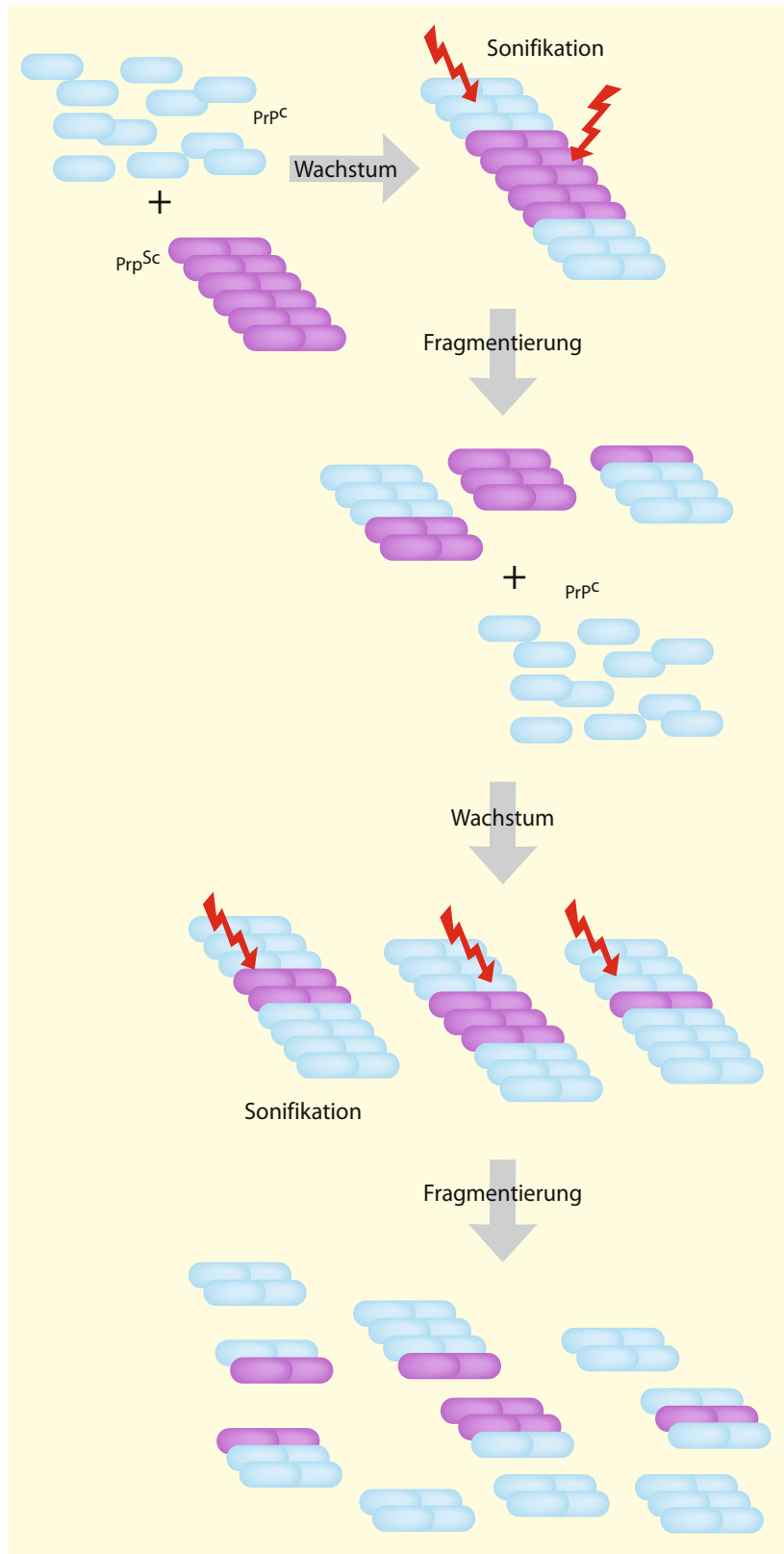
Ausgebreitet hat sich der Rinderwahn durch die Intensivmethoden der Landwirtschaft. Tierische Überreste – einschließlich der Gehirne – wurden zermahlen und wieder zu Tierfutter verarbeitet. In Futter für Kühe wurden die Kadaver von Schafen verarbeitet, deshalb hat man Rinderwahnsinn, der 1986 in England als Epidemie ausbrach, ursprünglich auf an Scrapie erkrankte Schafe zurückgeführt. Allerdings haben die Bewohner in England und anderen europäischen Ländern schon seit dem 18. Jahrhundert Schafe mit Scrapie verzehrt, ohne dass sich irgendwelche Anzeichen von Krankheit bemerkbar machten. Ebenso wenig haben irgendwelche anderen Nutztiere, einschließlich Kühe, jemals Scrapie bekommen, obwohl sie auf den gleichen Weiden grasten wie die Schafe. Außerdem sind Prionen von Schafen für Kühe nicht infektiös. Deshalb ist man inzwischen zu der Ansicht gelangt, dass im Gehirn einer Kuh, irgendwo in England Ende der 1970er- oder Anfang der 1980er-Jahre, durch einen zufälligen Flip-Flop-Mechanismus ein normales Prion in die abnorme Konformation umgewandelt wurde. Die abnormen Kuh-Prionen gelangten dann durch Wiederverwertung von Abfällen in das Tierfutter, konnten sich so ausbreiten und schließlich eine Epidemie verursachen. Nach Ausbruch des Rinderwahnsinns in England wurde die Wiederverwertung tierischer Abfälle zu Futtermitteln verboten, und infizierte Herden wurden vernichtet.

Rinderwahnsinn ist auch auf den Menschen übertragbar, allerdings ist die Infektionsrate äußerst niedrig. Die ersten Fälle beim Menschen wurden 1996 nachgewiesen und als **vCJD** (engl. *variant Creutzfeldt-Jakob disease*) bezeichnet, um die Herkunft zu verschleiern. Wenn die abnormen Kuh-Prionen den Menschen infizieren, treten jedoch die für Rinderwahnsinn charakteristischen Prion-Konformationen auf, nicht die der echten CJK. Bei Menschen mit CJK oder Kuru weisen die abnormen Prionen eine etwas andere Konformation auf. Dass sehr zufällig verstreut unter der gesamten Bevölkerung Menschen dem Rinderwahnsinn zum Opfer fielen, deutet darauf hin, dass nur relativ wenige Menschen anfällig für diese Infektion sind. Bis 2006 waren nur rund 200 Menschen, überwiegend in England, an BSE erkrankt. Berechnungen lassen auf eine durchschnittliche Inkubationszeit von 15 Jahren schließen. Daher wird die Zahl der Fälle wahrscheinlich auf 300 ansteigen. Damit liegen diese Schätzungen erheblich unter vielen früheren, recht emotional geprägten Vorhersagen. Sie zeigen, wie niedrig die Infektiosität von Prionen wirklich ist, wenn sie zwischen verschiedenen Arten übertragen werden.

Prion-Krankheiten – Scrapie, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und Rinderwahnsinn (BSE) – sind auf eine abnorme Konformation des Prion-Proteins zurückzuführen, das in großen Mengen in Nervengewebe, vor allem in Gehirn, synthetisiert wird. Man kennt erbliche, infektiöse und spontane Varianten von Prion-Krankheiten.

Nachweis pathogener Prionen

Das Auftreten von Rinderwahnsinn (BSE) hat es erforderlich gemacht, Rinder und deren Produkte auf die Anwesenheit der pathogenen Form des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) zu testen. Dies geschieht derzeit mit einem immunologischen Nachweis. Obwohl sich die dreidimensionale Konformation der normalen (PrP^{C}) und der pathogenen (PrP^{Sc}) Form unterscheiden, ist es bislang noch nicht gelungen, für jede Form spezifische Antikörper zu erlangen. Da die pathogene Form der Prionen resistent gegen Protease ist, werden die Proben zunächst mit Protease behandelt, um die normale (PrP^{C}) Form abzubauen, und dann



22.14 PMCA-Technik (*protein misfolding cyclic amplification*)

Zur Amplifikation muss man PrP^{Sc} in mehreren Zyklen in Anwesenheit eines Überschusses an PrP^C inkubieren und anschließend einer Sonifikation unterziehen. Während der Inkubationszeit nimmt die Größe der PrP^{Sc}-Aggregate (violett) aufgrund des Einbaus von normalem Prion-Protein (blau) zu. Durch die Ultraschallbehandlung werden die Aggregate aufgebrochen, und es entstehen weitere pathogene Einheiten, die eine Umwandlung bewirken können.

einem immunologischen Test durch Western Blotting (s. Kap. 6) unterzogen. Die ganze Prozedur ist sehr mühsam und nur mäßig empfindlich. Deshalb wäre ein Test äußerst wünschenswert, mit dem sich eine Prion-Krankheit schon vor Auftreten der Symptome nachweisen lässt, um genügend Zeit für eventuelle Behandlungen zu haben.

Durch die **PMCA-Technik** (engl. *protein misfolding cyclic amplification*) kann man Prionen mit abnormer Konformation auf analoge Weise amplifizieren wie DNA mittels PCR (Abb. 22.14). Dies ermöglicht einen sehr viel sensitiveren Nachweis von PrP^{Sc} in klinischen Proben. Dazu mischt man kleine Proben, die vermutlich PrP^{Sc} enthalten, mit normalem Gehirnhomogenat mit einem Überschuss an normalem PrP^C. Das PrP^C wird nun in PrP^{Sc} umgewandelt und in die wachsenden PrP^{Sc}-Aggregate eingebaut. Anschließend wird die Probe dann einer Sonifikation (Ultraschallbehandlung) unterzogen, um die Aggregate aufzubrechen. Der gesamte Vorgang wird mehrere Male wiederholt. Nach fünf Zyklen lässt sich im Allgemeinen eine 60-fache Zunahme erzielen.

Prionen sind technisch schwer nachzuweisen. Durch zyklische Amplifikation von Prionen (PMCA-Technik) konnte die Empfindlichkeit des Nachweises enorm gesteigert werden.

Behandlungsmöglichkeiten für Prion-Krankheiten

Derzeit gibt es für keine der Prion-Krankheiten eine wirkungsvolle Behandlungsmöglichkeit, obwohl zahlreiche Wirkstoffe getestet wurden und werden. Nur relativ wenige Medikamente können die Blut-Hirn-Schranke effektiv überwinden. Bei einem zufälligen Screening derjenigen, die dazu in der Lage sind, ergab sich jedoch, dass sich aus infizierten tierischen Zellen in Kultur sowohl mit Quinacrin als auch mit Chlorpromazin Prionen eliminieren ließen. (Quinacrin ist ein selten verwendetes Mittel gegen Malaria, Chlorpromazin wird verbreitet zur Behandlung von Schizophrenie eingesetzt.) Bei lebenden Tieren lässt sich die Krankheit mit diesen Mitteln leider nicht heilen. Zurzeit befinden sich mehrere hoch technisierte Methoden zur Behandlung von Prion-Krankheiten in der Entwicklung, allerdings wird noch keine davon klinisch angewendet.

Als alternative Methode bietet sich an, aus infektiösem Material die Prionen zu beseitigen. Vor einiger Zeit wurden Filter entwickelt, mit denen sich Prionen entfernen lassen. Die Entwicklung erfolgte durch ein Screening kombinatorischer Bibliotheken (s. Kap. 11) für Liganden, die an Prion-Protein banden. Die Liganden werden auf ein Harz aufgebracht und dann in eine Säule gegeben, um damit Blut und andere Flüssigkeiten, die aktive Prionen enthalten könnten, herauszufiltern. Als man Hamstern mit Scrapie infiziertes Hamsterblut injizierte, infizierten sich 15 von 99 Tieren; nach Filtration des Blutes durch eine Säule mit dem Affinitätsharz L13 kam es bei keinem der 96 Hamster im Test zu einer Infektion.

In Laborstudien macht man sich häufig die RNA-Interferenz (s. Kap. 5) zunutze, um die Genexpression zu unterdrücken. Man kann eine siRNA erzeugen, die bei Mäusen die Expression des *Prnp*-Gens unterdrückt. Um in mit Prionen infizierten Zellen die siRNA zu erzeugen, verwendet man einen Retrovirusvektor, der kurze Haarnadelschleifen-RNAs exprimiert. Diese werden in den Zielzellen durch Dicer (eine Helicase) in die siRNAs gespalten. Dies löst wiederum die gegen die *Prnp*-RNA gerichtete RNA-Interferenz aus, wodurch diese abgebaut wird. Retrovirusvektoren hat man verwendet, weil sie nichtwachsende Zellen wie die des Nervensystems infizieren können. Zumindest bei Mäusen konnte durch Injektion der Vektoren in den Schädel eine Reduktion der Prionenzahl erreicht werden, sodass diese Mäuse länger überlebten.

Als weitere Möglichkeit zur Bekämpfung von Prion-Krankheiten kommt in Betracht, das Prion-Gen bei Nutztieren auszuschalten. Vor einigen Jahren hat man transgene Mäuse erzeugt, denen beide Kopien des *Prnp*-Gens fehlen. Diese wachsen und entwickeln sich normal. Sie können kein Prion-Protein produzieren und sind resistent gegen Infektionen durch pathogene Prionen. Dadurch bestätigte sich, dass neue (und normale) Prion-Proteine zunächst von der Wirtszelle hergestellt werden, bevor sie im Zuge einer infektiösen Prion-Krankheit ihre Konformation ändern. Zum Überleben wird das Prion-Gen nicht benötigt, und noch ist seine genaue Funktion unklar. Offenbar ist es jedoch am Langzeitgedächtnis und am räumlichen Lernen beteiligt.

In jüngster Zeit wurden nun auch transgene Rinder erzeugt, denen beide Kopien des *Prnp*-Gens fehlen; nach zwei Jahren zeigen sie ein normales Wachstum und eine normale Entwicklung. Gehirnzellen dieser Tiere sind resistent gegen Prion-Infektionen. Nutztiere mit ausgeschaltetem *Prnp*-Gen könnte man

zur Produktion von Prion-freien Produkten nutzen, sofern transgene Tiere zur Herstellung von Lebensmitteln zugelassen werden.

Gegenwärtig gibt es keine Behandlung für Prion-Krankheiten. Es wurden allerdings einige Bleiverbindungen gefunden, mit denen man in Zellkultur teilweise Erfolge erzielen konnte.

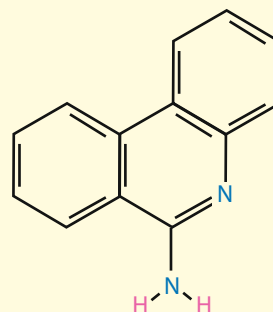
Verwendung von Hefe-Prionen als Modelle

Inzwischen wurde noch eine neue Screening-Methode für Verbindungen, die man zur Prionen-Therapie einsetzen kann, entwickelt; sie beruht auf der Verwendung von **Hefe-Prionen**. Wie sich herausgestellt hat, sind einige merkwürdige genetische Verhaltensweisen von Hefen auf Proteine zurückzuführen, die sich wie die Prionen von Säugetieren verhalten. Die Hefe-Prionen sind nicht letal, und es handelt sich nicht um Membran-, sondern um Cytoplasmaproteine. Trotzdem zeigen sie eine Nucleinsäure-freie Vererbung, und ihre falsch gefalteten Formen katalysieren die Umwandlung von normalen Proteinen in abnorme Konformationen. Darüber hinaus bilden die falsch gefalteten Formen der Hefe-Prionen unlösliche **Amyloidaggregate** wie die von Säugetieren. Trotz ähnlicher Strukturdomänen zeigen die Prion-Proteine von Säugetieren und Hefen aber keine Sequenzhomologie.

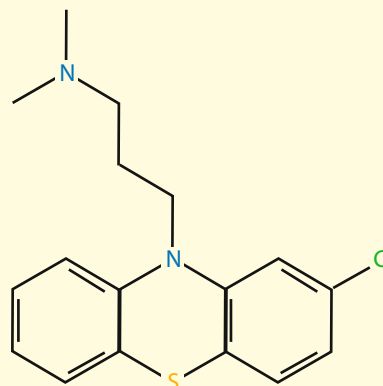
Die bekanntesten Hefe-Prionen sind [URE3] und [PSI+], die abnormen Konformationen der Proteine Ure2p und Sup35p. Ure2p ist an der Stickstoffregulation beteiligt, Sup35p ist ein Terminationsfaktor der Translation. Bei Hefen werden Prionen durch Funktionsverlust nachgewiesen. Beispielsweise ist die Prion-Form [PSI+] des Sup35p-Proteins unlöslich und inaktiv. Das führt dazu, dass vermehrt über Stoppcodons hinweggelesen wird. Das bildet die Grundlage für ein ausgeklügeltes, schnelles genetisches Screening-System für potenzielle Medikamente gegen Prionen.

Hefemutanten mit defekter Adenin-Biosynthese verfärben sich durch die Ansammlung von Nebenprodukten des Stoffwechsels rot. Eine Hefemutante mit einer Nonsense-Mutation (d.h. einem vorzeitigen Stoppcodon) im ADE1-Gen bildet somit rote Kolo-

6-Aminophenanthridin



Chlorpromazin



Quinacrin

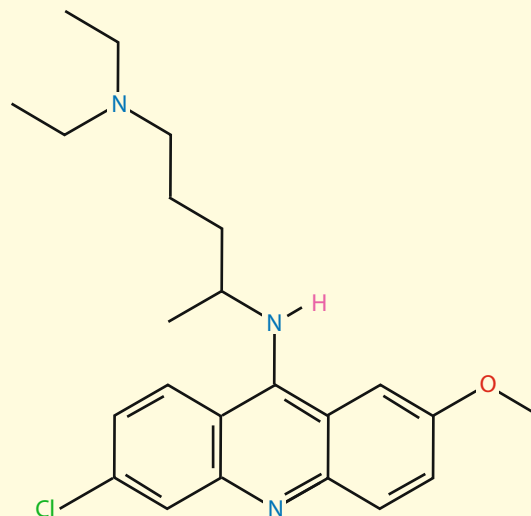


Abb. 22.15 Wirkstoffe gegen Prionen

Die Strukturen von 6-Aminophenanthridin, Chlorpromazin und Quinacrin.

nien. Liegt das Sup35p-Protein in seiner Prion-Form vor, so kommt es dazu, dass über Stoppcodons hinweggelesen wird und genügend Protein vollständiger Länge für eine Adeninsynthese produziert wird – mit anderen Worten, die Mutation wird unterdrückt. Folglich bilden Prion-positive Stämme weiße Kolonien. Bei einem Verlust der Prionen gehen die Hefen wieder zur Bildung roter Kolonien über. Aufgrund dieser Färbung kann man chemische Verbindungen einem raschen Screening unterziehen, indem man sie einfach zum Medium hinzugibt und dann schaut, welche davon einen Farbwechsel von Weiß nach Rot bei den Hefekolonien bewirken. Im Jahr 2003 hatte man bereits einige Kandidaten identifiziert (Abb. 22.15). Bei allen handelte es sich um trizyklische Verbindungen wie Quinacrin und Chlorpromazin. Die aktivsten waren 6-Amino-Derivate von Phenanthridin. Man hofft, durch diese Methode eine wirkungsvolle Behandlungsmöglichkeit für Prion-Krankheiten zu finden.

Inzwischen wurden bei Hefen Prionen entdeckt. Dies ermöglichte ein systematisches Screening nach Wirkstoffen gegen Prionen.

► Weiterführende Literatur

- Balzarini J (2007) Carbohydrate-binding agents: A potential future cornerstone for the chemotherapy of enveloped viruses? *Antivir Chem Chemother* 18: 1–11
- Crusat M, de Jong MD (2007) Neuraminidase inhibitors and their role in avian and pandemic influenza. *Antivir Ther* 12: 593–602
- D'Cruz OJ, Uckun FM (2006) Dawn of non-nucleoside inhibitor-based anti-HIV microbicides. *J Antimicrob Chemother* 57: 411–423
- De Clercq E (2005) Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Curr Opin Microbiol* 8: 552–560
- De Clercq E (2006) Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* 5: 1015–1025
- Haasnoot J, Berkhout B (2006) RNA interference: Its use as antiviral therapy. *Handb Exp Pharmacol* 173: 117–150
- Haller O, Staeheli P, Kochs G (2007) Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89: 812–818
- Hovanessian AG, Justesen J (2007) The human 2'-5' oligoadenylate synthetase family: Unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie* 89: 779–788
- Karpala AJ, Doran TJ, Bean AG (2005) Immune responses to dsRNA: Implications for gene silencing technologies. *Immunol Cell Biol* 83: 211–216
- Kocisko DA, Caughey B (2006) Searching for anti-prion compounds: Cell-based high-throughput *in vitro* assays and animal testing strategies. *Methods Enzymol* 412: 223–234
- Lori F, Folli A, Kelly LM, Lisiewicz J (2007) Virostatics: A new class of anti-HIV drugs. *Curr Med Chem* 14: 233–241
- Pestka S (2007) The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 282: 7–51
- Pinto LH, Lamb RA (2007) Controlling influenza virus replication by inhibiting its proton channel. *Mol Biosyst* 3: 18–23
- Reece PA (2007) Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses. *J Med Virol* 79: 1577–1586
- Reiche EM, Bonametti AM, Voltarelli JC, Morimoto HK, Watanabe MA (2007) Genetic polymorphisms in the chemokine receptors: Impact on clinical course and therapy of the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1). *Curr Med Chem* 14: 1325–1334
- Rottinghaus ST, Whitley RJ (2007) Current non-AIDS antiviral chemotherapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5: 217–230
- Rusconi S, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT (2007) An update in the development of HIV entry inhibitors. *Curr Top Med Chem* 7: 1273–1289
- Sakudo A, Nakamura I, Ikuta K, Onodera T (2007) Recent developments in prion disease research: Diagnostic tools and *in vitro* cell culture models. *J Vet Med Sci* 69: 329–337
- Scherer L, Rossi JJ, Weinberg MS (2007) Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther* 14: 1057–1064
- Soto C, Estrada L, Castilla J (2006) Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem Sci* 31: 150–155
- Souvignet C, Lejeune O, Trepo C (2007) Interferon-based treatment of chronic hepatitis C. *Biochimie* 89: 894–898
- Vana K, Zuber C, Nikles D, Weiss S (2007) Novel aspects of prions, their receptor molecules, and innovative approaches for TSE therapy. *Cell Mol Neurobiol* 27: 107–128
- Wang X, Jia W, Zhao A, Wang X (2006) Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine. *Phytother Res* 20: 335–341
- Wickner RB, Edskes HK, Shewmaker F, Nakayashiki T (2007) Prions of fungi: Inherited structures and biological roles. *Nat Rev Microbiol* 5: 611–618

Biologische Kriegsführung und Bioterrorismus

Einführung

Bakterien produzieren für andere Organismen letale Proteine

Bakteriologische Kriegsführung unter niederen Eukaryoten

Die Geschichte der biologischen Kriegsführung beim Menschen

Erwartung und Kosten

Wichtige Faktoren bei der biologischen Kriegsführung

- Inkubationszeit

- Ausbreitung

- Persistenz der Erreger

- Aufbewahrung der Erreger

- Präparation der Erreger

- Hochsicherheitslaboratorien

Welche Krankheitserreger eignen sich zur biologischen Kriegsführung?

Milzbrand

Der Milzbrandanschlag in den USA im Jahr 2001

Andere bakterielle Erreger

Pockenvirus

Andere virale Erreger

Gereinigte Toxine als Biowaffen

Botox – Botulinustoxin

Ribosomen-inaktivierende Proteine

Gegen die Landwirtschaft gerichtete biologische Kriegsführung

Gentechnische Modifikation infektiöser Erreger

Erzeugen getarnter Viren

Biosensoren und der Nachweis von Biowaffen

Weiterführende Literatur

Einführung

Biologische Kriegsführung umfasst mehrere Dinge: die Auswahl eines Erregers oder Kampfstoffs, dessen potenzielle gentechnische Veränderung, aber auch dessen Herstellung, Speicherung, Umwandlung in eine Biowaffe und Verbreitung. Dieses Kapitel befasst sich mit der Molekularbiologie der biologischen Kriegsführung, während die physikalischen und militärischen Aspekte unberücksichtigt bleiben.

Zudem leidet diese Thematik unter einem Mangel an verifizierbaren Informationen. Der Vorwurf des Einsatzes oder der Entwicklung von Biowaffen erweist sich häufig als Propagandatricks ohne irgendwelche reale Grundlage. Häufig reichte es aus, dass eine verdächtige Krankheit ausbrach, und schon wurde der Verdacht der biologischen Kriegsführung ausgesprochen, vor allem in Zeiten des Kalten Krieges. Es ist praktisch schon zur Routine geworden, dass Nationen, welche die US-Regierung mit dem angeblichen Besitz von „Massenvernichtungswaffen“ verunsichern, der biologischen Kriegsführung beschuldigt werden. Die offizielle Liste der Nationen, die angeblich Biowaffen entwickeln, ändert sich mit der ständig wechselnden politischen Lage. Infolgedessen sind verlässliche Informationen zur mutmaßlichen bakteriologischen Kriegsführung nur schwer zu bestätigen.

Die biologische Kriegsführung unter Menschen ist politisch umstritten, harte Fakten sind oft Mangelware.

Bakterien produzieren für andere Organismen letale Proteine

Bevor wir uns mit Biowaffen des Menschen befassen, soll daran erinnert werden, dass Organismen auf allen Stufen der Evolutionsleiter während der gesamten Entwicklungsgeschichte biologische Kriegsführung betrieben haben. Viele der folgenden Beispiele wurden bereits unter anderen Überschriften aufgeführt. Hier sollen sie zunächst kurz zusammengefasst werden, bevor wir uns dann dem absichtli-

chen Einsatz biologischer Waffen bei menschlichen Konflikten zuwenden.

Konkurrieren verwandte Bakterien um Lebensraum oder Ressourcen, töten sie einander häufig mithilfe von toxischen Proteinen ab, die man als **Bakteriocine** bezeichnet. Im Allgemeinen töten Bakterien eher ihre nahen Verwandten, denn je näher zwei Bakterienstämme miteinander verwandt sind, desto eher werden sie um dieselben Ressourcen konkurrieren. So nutzen beispielsweise viele Stämme von *Escherichia coli* eine große Anzahl von Bakteriocinen, die man als **Colicine** bezeichnet. Diese sind darauf ausgerichtet, andere Stämme derselben Art abzutöten. Die Gene für Colicine liegen normalerweise auf Plasmiden. Die Colicinplasmide von *E. coli* dienen als Grundlage für zahlreiche Plasmide, die in der Molekularbiologie und Gentechnik häufig Verwendung finden (s. Kap. 1). Der bakterielle Erreger der Pest, *Yersinia pestis*, stellt ebenfalls Bakteriocine her, die gegen konkurrierende Stämme der eigenen Art gerichtet sind und in diesem Fall Pesticine heißen.

Wenn von Bakterien produzierte Proteine gegen höhere Organismen gerichtet sind, spricht man von **Toxinen**. Der Unterschied in der Terminologie zwischen *Bakteriocinen* und *Toxinen* hängt also lediglich von der jeweiligen Perspektive ab. Bakteriocine werden von den Bakterien mit gezielter Tötungsabsicht gegen Vertreter der eigenen Art eingesetzt. Im Gegensatz dazu „beabsichtigen“ pathogene Bakterien in der Regel nicht, die von ihnen infizierten Menschen zu töten. Je länger der Wirtsorganismus am Leben bleibt, desto länger kann er die infizierenden Bakterien beherbergen. Bakterien infizieren auch Insekten und stellen Toxine her, die nur Insekten abtöten, für Wirbeltiere hingegen harmlos sind. Das Bakterium *Bacillus thuringiensis* hat weithin Bekanntheit erlangt, weil es ein Toxin produziert, das Schadinsekten abtötet. Auf die Verwendung von Bt-Toxin zur Herstellung gentechnisch modifizierter Nutzpflanzen wurde bereits in Kapitel 14 eingegangen.

Bakteriocine sind von Bakterien produzierte toxische Proteine; sie dienen dem gezielten Abtöten anderer Bakterien, die um dieselben natürlichen Ressourcen konkurrieren. Bakterien stellen auch Proteine her, die für Insekten und höhere Tiere tödlich sind.

Bakteriologische Kriegsführung unter niederen Eukaryoten

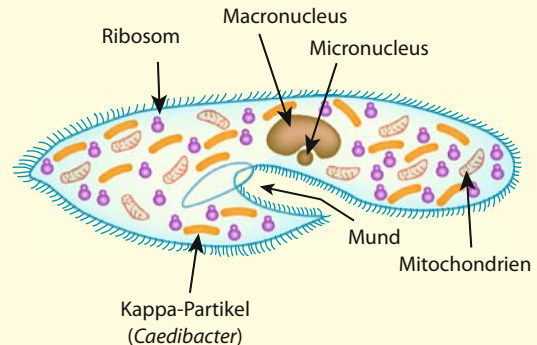
Das Pantoffeltierchen *Paramecium* ist ein bekanntes Protozoon aus der Gruppe der Ciliaten (Wimpertierchen). Viele Stämme von *Paramecium* enthalten symbiontische Bakterien (*Caedibacter*), die man als **Kappa-Partikel** oder Kappa-Faktoren bezeichnet. Sie wachsen und teilen sich innerhalb der größeren eukaryotischen *Paramecium*-Zelle (Abb. 23.1). *Paramecium*-Stämme mit Kappa-Partikeln nennt man **Killer**. Werden Kappa-Partikel von einem Killer freigesetzt und von einem anderen, sensiblen *Paramecium* aufgenommen (d.h. einem ohne Kappa-Partikel), so wird dieses abgetötet. Bei der Verdauung des Kappa-Partikels wird ein toxisches Protein freigesetzt, welches das sensible *Paramecium* abtötet. Somit praktizieren auch einzellige Eukaryoten bakteriologische Kriegsführung.

Das Toxingen befindet sich nicht auf dem Chromosom des symbiontischen Bakteriums, sondern auf einem bakteriellen Plasmid, das von einem defekten Bakterienvirus stammt. Ein Toxin, das von einem Virus codiert wird, welches die Kappa-Partikel infiziert, erfüllt nun also einen anderen Zweck, nämlich andere *Paramecium*-Stämme abzutöten. Dabei scheint es sich um ein allgemeines Prinzip zu handeln. Zahlreiche der von pathogenen Bakterien verwendeten Toxine, die Menschen infizieren, werden von DNA codiert, die nicht chromosomalen Ursprungs ist, sondern von Viren, Plasmiden oder Transposons stammt. Häufig sind diese Elemente in das Chromosom pathogener Bakterienstämme eingebaut.

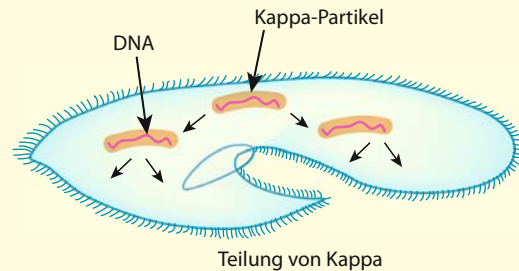
Manche Insekten nutzen Viren zur biologischen Kriegsführung. Bestimmte parasitische Wespen legen ihre Eier in die herbivoren Larven pflanzenfressender Insekten. Nach dem Schlüpfen fressen die neugeborenen Wespen die lebenden Larven von innen her auf, und schließlich kommt eine neue Wespengeneration hervor.

Das Geheimnis der Wespen liegt darin, dass sie zusammen mit ihren Eiern auch ein Virus injizieren (Abb. 23.2). Das Virus aus der Familie der Adenoviren zielt auf den sogenannten Fettkörper der Larven ab (der in etwa der Leber höherer Tiere entspricht). Es schädigt sowohl das System zur Entwicklungssteuerung der Larve als auch ihr primitives Immunsystem. Dadurch verliert die Larve ihren Appetit für pflanzliche Nahrung; außerdem wird verhindert,

a Killer-*Paramecium* enthält *Caedibacter*



b Kappa-Partikel teilen sich innerhalb von *Paramecium*

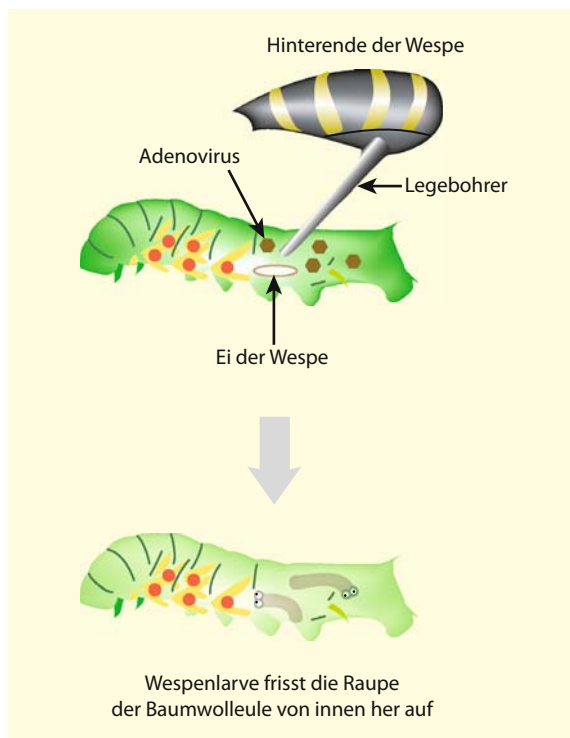


23.1 Killer-*Paramecien* verwenden ein bakterielles Toxin

a Die Kappa-Partikel sind im Cytoplasma von *Paramecium* enthalten. b Bei den Kappa-Partikeln handelt es sich um das symbiontische Bakterium *Caedibacter*. Sie kommen bei zahlreichen *Paramecium*-Stämmen vor, besitzen aber ihre eigene DNA und teilen sich wie typische Bakterien.

dass sie sich häutet und in eine Puppe verwandelt – das nächste Stadium auf dem Weg zu einem adulten Insekt, das dann weitere Eier legen kann. Es gibt viele Formen pflanzenfressender Larven, darunter auch bedeutende Landwirtschaftsschädlinge wie die Baumwollcicade und der Baumwollkapselwurm. Diese werden von vielen Wespen attackiert und somit auch von vielen Virenformen, die jeweils auf eine bestimmte Insektenlarve abzielen.

Niedere Eukaryoten nutzen im Kampf gegen Konkurrenten oder zur Überwältigung von Beutetieren häufig bakterielle Toxine oder Viren.



23.2 Parasitische Wespen setzen Viren gegen Larven ein

Bestimmte parasitische Wespen legen ihre Eier in die Raupen von Baumwollraupen. Die Wespen landen auf dem Hinterende der Raupe und injizieren mit ihrem Eilegeapparat (Legebohrer) ein Ei plus Adenoviren in die Raupe. Das Adenovirus bewirkt, dass die Larve die Nahrungsaufnahme einstellt und sich nicht in eine Puppe verwandelt. Die aus dem Ei schlüpfende Wespenlarve frisst die Raupe von innen her auf und entwickelt sich zu einer adulten Wespe.

Die Geschichte der biologischen Kriegsführung beim Menschen

Als ursprünglichste Form einer Kriegsführung, die zum Ziel hatte, das Überleben des Feindes mit biologischen Mitteln zu untergraben, ist vermutlich das Abbrennen von Nahrungspflanzen anzusehen. Früh in der Geschichte stellte auch die Wasserversorgung ein bedeutendes biologisches Ziel für sich befehden- de Nomaden dar, insbesondere in Gebieten, in denen Wasser knapp war. Vermutlich warfen die Menschen tote oder verwesende Tiere in Wasserstellen und ver-

gifteten so das Trinkwasser – eine relativ wirkungs- volle Methode, um Feinde zu vertreiben.

Immer wieder in der Geschichte gibt es Belege für sporadische Versuche, zu militärischen Zwecken absichtlich Infektionen zu verbreiten. Allerdings erwiesen sich diese in den meisten Fällen als ineffektiv oder unbedeutend. Während der als **Schwarzer Tod** bekannt gewordenen Pestepidemie Mitte des 13. Jahr- hunderts katapultierten Tartaren von der Pest heimge- suchte Leichen über die Mauern der Städte ihrer euro- päischen Feinde. Angeblich soll dies zur Ausbreitung der Pest beigetragen haben. In Wirklichkeit wurde die **Pest** jedoch von Ratten und Flöhen verbreitet, nicht durch Kontakt mit Leichen. In Anbetracht der hygie- nischen Verhältnisse in den meisten mittelalterlichen Städten und Burgen war es kaum nötig, von außen Infektionsquellen einzuschleusen. Da Pest, Typhus, **Pocken**, Ruhr und Diphtherie bereits allgegenwärtig waren, brauchte man nur der Natur ihren Lauf zu las- sen. Als ebenso ineffektiv und weitgehend irrelevant erwiesen sich die Versuche der weißen Siedler, unter den Indianern Amerikas Pocken zu verbreiten, da sich die Pocken bereits selbst ausgebreitet hatten.

Dass bakteriologische Kriegsführung bis vor kurzem kaum Bedeutung erlangte, liegt daran, dass zahlreiche gefährliche Infektionen bereits im Umlauf waren. Unter den beengten und unhygienischen Ver- hältnissen in einer Armee startete eine Krankheit von Natur aus einen biologischen Angriff, ohne dass man diesen künstlich auslösen musste. Bis vor nicht allzu langer Zeit herrschten sowohl in Armeen als auch in der Zivilbevölkerung so schlechte Hygienebedingun- gen, einhergehend mit einer großen Durchseuchung mit Krankheiten, dass eine bakteriologische Kriegs- führung bedeutet hätte, Eulen nach Athen zu tragen. Erst in unserem heutigen desinfizierten Zeitalter ist die absichtliche Ausbreitung von Krankheiten zu einer wirklichen Bedrohung geworden.

Die biologische Kriegsführung hat zwar eine lange Geschichte, sie erwies sich jedoch selten als effek- tiv. Dies liegt vermutlich vor allem an den massiven Auswirkungen natürlicher Infektionskrankheiten.

Erwartung und Kosten

Während des Vietnamkriegs hoben die Vietcong- Guerillas oft getarnte Fallgruben aus. Dort hinein steckten sie zugespitzte Bambusstöcke, die sie mit

menschlichem Leichengift beschmierten. Natürlich konnte man sich dadurch eine schlimme Infektion zuziehen, viel bedeutender war jedoch die psychologische Wirkung. Die Sorge, nicht in solche Fallgruben zu geraten, behinderte die Truppenbewegungen der Amerikaner weit mehr, als die tatsächlichen Todesfälle. Mit der Androhung einer chemischen oder biologischen Kriegsführung lässt sich also eine enorme psychologische Wirkung erzielen. Ein Beispiel hierfür aus jüngerer Zeit ist der Bioterrorismus mit Milzbrand in den Vereinigten Staaten. Allerdings sind dem **West-Nil-Virus**, das sich auf natürliche Weise ausbreitete, um ein Vielfaches mehr Menschen zum Opfer gefallen als den gezielt verbreiteten Milzbrandsporen. Die Milzbrandhysterie führte jedoch zu einem kolossalen Zusammenbruch der Postzustellung und verursachte gewaltige Kosten.

Schutzmaßnahmen gegen potenzielle biologische Angriffe sind kostspielig und umständlich. Es ist schlichtweg unmöglich, Soldaten gegen sämtliche Krankheiten zu impfen, die auf diese Weise verbreitet werden könnten. Zudem haben Impfstoffe mitunter Nebenwirkungen, insbesondere, wenn sie aus der Not heraus ohne eingehende Tests entwickelt wurden. Nehmen wir den von der US-Armee verwendeten Milzbrandimpfstoff, der 1971 zugelassen wurde. Er wurde ausgiebigen Tests unterzogen und gilt als relativ sicher. Für einen ausreichenden Impfschutz sind sechs Impfungen und eine jährliche Auffrischungsimpfung erforderlich. Bei 5–8 % der Geimpften treten an der Injektionsstelle Schwellungen und Hautreizungen auf, bei 1 % schwere lokale Reaktionen. Umfangreichere systemische Reaktionen sind „selten“. Der Impfstoff wirkt zwar gegen „natürlichen“ Kontakt, ob er jedoch auch Schutz vor in hoher Konzentration versprühten Milzbrandsporen bieten würde, ist zu bezweifeln. Schutzkleidung und Atemschutzmasken behindern die Infanterie und schränken ihre Beweglichkeit ein, sodass die Soldaten zu einem leichteren Ziel für gewöhnliche Waffen werden. Unter heißen klimatischen Bedingungen kann zusätzliche Kleidung auch eine starke Wärmebelastung mit sich bringen.

Doch selbst ohne absichtliche bakteriologische Kriegsführung sind Truppen aus den hygienischen Industrienationen der gemäßigten Breiten beim Einsatz unter tropischen Bedingungen in der Dritten Welt im Nachteil. Medikamente gegen Malaria und andere auf die Tropen beschränkte Infektionskrankheiten sind kostspielig und nur selten zu 100 % wirksam. Über längere Zeit eingenommen, können sie die Gesundheit beeinträchtigen. Ständiger Kontakt mit

Insektiziden, die Stechmücken, Läuse und so weiter vernichten sollen, kann Schädigungen des Nervensystems nach sich ziehen. Als zusätzlicher Faktor kommt hinzu, dass die Einwohner wohlhabender westlicher Nationen heute eine Lebenserwartung von über 70 oder gar 80 Jahren haben. Personen, die in die rückständigen Gebiete der Welt geschickt werden, benötigen daher immer bessere Schutzmaßnahmen und Medikamente. Deshalb werden militärische Aktionen in Ländern der Dritten Welt zunehmend kostspieliger. Truppen der von Armut geplagten Regierungen vor Ort werden hingegen nicht von zusätzlicher schützender Ausstattung belastet, die sie sich ohnehin nicht leisten können. Hinzu kommt, dass für die Regierungen überbevölkerter Nationen, in denen eine sehr viel geringere Lebenserwartung herrscht, menschlichen Todesopfern eine weit geringere Bedeutung zukommt. In den letzten 50 Jahren haben bewaffnete Interventionen in der Dritten Welt durch Nationen wie die Sowjetunion und die Vereinigten Staaten ständig an Einsatzfreude und Effektivität eingebüßt, was zumindest teilweise an den eben genannten Gründen liegt.

Die Wirkung der biologischen Kriegsführung beruht größtenteils auf der psychologischen Bedrohung.

Wichtige Faktoren bei der biologischen Kriegsführung

Die Strategie der bakteriologischen Kriegsführung besteht im Grunde darin, eine menschliche Krankheit auszuwählen und damit Gegner zu eliminieren oder zu vertreiben. Vielleicht lässt sich der Krankheitserreger durch gentechnische Methoden sogar noch verbessern, wie weiter unten erläutert. Es müssen jedoch einige wesentliche Faktoren berücksichtigt werden. Die relative Bedeutung dieser Faktoren hängt davon ab, ob die Biowaffen zur militärischen Verwendung gedacht sind oder von Terroristen eingesetzt werden.

Inkubationszeit

Zu den grundlegenden Problemen der biologischen Kriegsführung zählt, dass Infektionskrankheiten nur langsam zum Tod führen. Selbst bei den virulentesten Pathogenen wie dem Ebola-Virus oder dem

Erreger der Lungenpest vergehen einige Tage, bis der Tod eintritt. Infizierte Personen wären also immer noch eine nicht unerhebliche Zeit kampffähig. Im Gegensatz dazu töten konventionelle Waffen rasch oder machen schnell kampfunfähig.

Ausbreitung

Ein weiterer Nachteil der bakteriologischen Kriegsführung ist das Problem der Ausbreitung. Meist sollen die Infektionserreger irgendwie über die Luft verteilt werden. Dadurch unterliegt die Ausbreitung den Launen des Wetters. Man braucht nicht nur entsprechenden Wind, dieser muss auch noch in die richtige Richtung wehen. In den 1950er-Jahren führte die britische Regierung Feldversuche mit harmlosen Bakterien durch. Wenn der Wind diese über „gesundes“ Ackerland wehte, überlebten viele der Bakterien und setzten sich lebend am Boden ab. Gingen die Bakterien hingegen über Industriegebieten nieder, wurden sie fast alle noch in der Luft abgetötet – vor allem wenn Erdölraffinerien und ähnliche Einrichtungen in der Nähe waren. Bei einer Verbreitung über die Luft wäre selbst bei richtiger Windrichtung der Großteil der Bevölkerung von Industrienationen durch die Luftverschmutzung in Großstädten zumindest teilweise vor den Bakterien geschützt.

Zusätzlich sind viele Erreger von Infektionskrankheiten empfindlich gegen Austrocknung und werden inaktiv, wenn sie längere Zeit der Luft ausgesetzt sind. Auch die natürliche UV-Strahlung inaktiviert viele Bakterien und Viren. Daher müssen die meisten Biowaffen vor diesem „Freiluftfaktor“ geschützt und so schnell wie möglich verbreitet werden.

Die Ausbreitung durch Terroristen steht unter ganz anderen Voraussetzungen. In kleinen Dosen können Biowaffen individuell auf unterschiedliche Weise verbreitet werden – beispielsweise durch Verschicken von Briefen mit Milzbrandsporen. Die minimalistischste Ausbreitungsstrategie setzt auf Freiwillige: Diese werden infiziert und reisen dann in überfüllten Verkehrsmitteln zusammen mit der Zielbevölkerung.

Persistenz der Erreger

Nach erfolgreichem Einsatz von Biowaffen möchte der Sieger vermutlich in das Gebiet einwandern und das feindliche Territorium übernehmen. Je nach Überlebenszeit des Erregers in der Umwelt werden

dadurch auch die einwandernden Truppen dem Infektionserreger ausgesetzt. **Milzbrand (Anthrax)** gehört zu den beliebtesten biologischen Waffen, weil die Erreger rasch wirken und sehr leicht zum Tod führen. Unglücklicherweise breitet sich *Bacillus anthracis*, der Erreger der Krankheit, durch die Bildung von Sporen aus, die sehr widerstandsfähig und nur schwer zu zerstören sind und extrem lange Zeit überdauern. Unter geeigneten Bedingungen keimen diese Sporen wieder aus und nehmen wie normale Bakterienzellen das Wachstum auf. Viele Viren überdauern hingegen außerhalb ihres tierischen oder menschlichen Wirtes – wenn überhaupt – nur wenige Tage. Durch diese Erreger hervorgerufene Infektionen können jedoch in der Bevölkerung vor Ort überdauern – auch dies kann sich als Gefahr für eine einmarschierende Armee erweisen.

Aufbewahrung der Erreger

Aus militärischer Sicht kann es also bei einer Besetzung unpraktisch sein, wenn ein Erreger von Infektionskrankheiten überdauert. Bei einem rasch vergänglichen Erreger stellt sich hingegen das entgegengesetzte Problem: Er lässt sich nur schwer aufbewahren.

Präparation der Erreger

Einige pathogene Mikroorganismen lassen sich relativ leicht in Zellkultur züchten, während andere extrem schwer und/oder nur unter hohem Kostenaufwand in geeigneter Menge zu produzieren sind. Zu den großen Nachteilen von Viren zählt, dass sie sich nur in Wirtszellen vermehren können. Tierische Zellen sind weitaus schwieriger zu kultivieren als Bakterien und erbringen einen sehr viel geringeren Ertrag. Viren in großem Umfang zu produzieren ist ziemlich teuer und aufwendig. Viele Bakterien (z.B. die Erreger von Pest, Tularämie und Typhus) lassen sich relativ leicht kultivieren. In den Jahren kurz nach dem Zweiten Weltkrieg züchteten die Briten in großen Kulturen kontinuierlich die Erreger der Pest, *Yersinia pestis*, um sie im Notfall parat zu haben. Zweifellos haben andere Nationen auch so etwas gemacht.

Ein weiterer Faktor ist das Problem der richtigen „Rezeptur“. Mit anderen Worten, der Krankheitserreger muss so präpariert werden, dass eine Aufbewahrung und Ausbreitung möglich ist. Bakterienzellen

und -sporen verklumpen meist spontan. Daher muss man sie erst zu Waffen machen, um sie in Form von Aerosolen oder anderen Verteilungssystemen verbreiten zu können. Das ist vor allem eine Frage der Technik und sprengt den Rahmen dieses Buches.

Hochsicherheitslaboratorien

Neben den Problemen, die mit der Kultur von Bakterien und Viren einhergehen, muss auch noch berücksichtigt werden, das Personal, das mit den infektiösen Erregern arbeitet, in geeigneter Weise zu schützen. Für Forschungen und Entwicklungen auf solchen Gebieten braucht man Hochsicherheitslaboratorien. Die biologische Sicherheit wird in vier Stufen unterteilt. Für Arbeiten mit Erregern wie dem Ebola-Virus benötigt man Laboratorien der **Biologischen Schutzstufe** (engl. *biosafety level*, BSL) 4. Sämtliche Arbeiten werden an Sicherheitswerkbänken mit Handschuheingriffen durchgeführt. Das ganze Labor ist abgeschottet und wird einem leichten Unterdruck ausgesetzt. Das sorgt dafür, dass im Fall einer undichten Stelle Luft nach innen strömt und nicht nach außen. Vor dem Betreten eines Hochsicherheitslabors muss man zunächst die Kleidung wechseln und spezielle Laborkleidung anziehen – in Extremfällen

nicht nur Laborkittel, sondern auch Laborunterwäsche. In den höchsten Sicherheitsstufen kann sogar eine raumanzugähnliche Schutzkleidung erforderlich sein (Abb. 23.3). Der Eintritt erfolgt über eine Luftschleuse, an den Ausgängen befinden sich Desinfektionsduschen und UV-Lampen. Die Laborkleidung wird abgelegt. In manchen Hochsicherheitslaboratorien ist der einzige Ausgang so konstruiert, dass man das Labor nur total untergetaucht durch ein Becken mit Desinfektionsmittel verlassen kann. Mittels UV-Licht werden sowohl die Laboratorien selbst als auch die Luftschleusen sterilisiert, vor allem bei Arbeiten mit Viren.

Hochsicherheitslaboratorien sind nicht nur sehr kostspielig, sondern auch äußerst zeitintensiv. Auch für die Herstellung von Biowaffen sind Hochsicherheitsvorkehrungen notwendig. Hierbei ist alles in großem industriellen Maßstab und die Probleme sind ebenfalls größer. Im Gegensatz dazu machen sich Terroristen vermutlich nur Gedanken darüber, dass ihr Tun geheim bleibt, und nehmen bewusst Risiken in Kauf, die für Industrienationen inakzeptabel sind. Auch Diktaturen in der Dritten Welt zerbrechen sich vermutlich nicht den Kopf über mögliche Todesopfer. Gelangt ein mutmaßlicher biologischer Kampfstoff allerdings in die dort lebende Bevölkerung, zieht er unwillkommene Aufmerksamkeit auf sich.



23.3 Biologische Schutzkleidung einst und jetzt

Links: Selbst während der Pest trugen Ärzte eine Schutzkleidung, um nicht den tödlichen Erregern ausgesetzt zu sein, hier illustriert in Bartholin, Thomas, Hafniae, 1654–1661: *Historiarum anatomicarum*. Mit freundlicher Genehmigung der U.S. National Library of Medicine. Rechts: Die heutigen Anzüge sind schnittiger, dienen aber dem gleichen Zweck. Laborant mit Schutzkleidung der Biologischen Schutzstufe 4. Mit freundlicher Genehmigung von USAMRIID, DoD und NIAID Biodefense Image Library.

Neben der Natur und den Eigenschaften des verwendeten Erregers haben noch zahlreiche physikalische Faktoren Einfluss auf den Einsatz von Biowaffen.

Welche Krankheitserreger eignen sich zur biologischen Kriegsführung?

Welche Krankheiten eignen sich am besten? Durch Bakterien, Viren oder Eukaryoten ausgelöst? Die meisten bakteriellen Krankheiten lassen sich im Prinzip mit Antibiotika heilen, Viruserkrankungen hingegen nicht. Andererseits sind Bakterien einfacher zu züchten als Viren. Viele Bakterien wachsen auf relativ einfachen, preiswerten Kulturmedien. Für die Produktion von Viruspartikeln muss man jedoch die Wirtszellen des Virus kultivieren; dies erschwert die Angelegenheit, weil tierische Zellen komplexere Anforderungen an die Zellkultur stellen. Pathogene Eukaryoten wie *Plasmodium* (der Erreger von Malaria) oder *Entamoeba* (der Erreger der Amöbenruhr) wurden nur selten als mögliche Biowaffen in Betracht gezogen, weil man sie nur schwer in großem Maßstab züchten kann. Eine mögliche Ausnahme sind pathogene Pilze, von denen sich einige relativ leicht vermehren lassen. Eine groß angelegte Kultur von Viren mag zwar für eine Regierung durchführbar sein, für kleine bioterroristische Gruppen ist dies vermutlich kaum praktikabel.

Außerhalb der Tropen gehen die meisten unheilbaren Infektionskrankheiten auf Viren zurück. Das grundlegende Problem hierbei ist, dass es sich bei den Viren nicht um lebende Zellen handelt; sie sind für den Zusammenbau neuer Viruspartikel darauf angewiesen, ihre spezifischen Wirtszellen zu infizieren. Folglich töten chemische Substanzen, die eine Replikation der Viren verhindern, in der Regel auch die Wirtszellen ab. Bislang ist eine kleine, aber zunehmende Zahl spezifischer Wirkstoffe gegen Viren verfügbar (s. Kap. 22); dennoch gibt es für die meisten Viruserkrankungen noch keine Heilmöglichkeit. Vor vielen Viruserkrankungen wie Mumps, Masern und Pocken kann man sich durch eine Impfung schützen. Als Schutz gegen eine virale Biowaffe bräuchte man jedoch einen wirkungsvollen Impfstoff gegen den verwendeten Virenstamm, und man müsste ei-

Exkurs 23.1

Anforderungen an potenzielle Biowaffen

Nach Angaben der US-Armee sollte ein als Biowaffe eingesetzter Organismus oder Kampfstoff folgende Anforderungen erfüllen:

1. Er sollte durchweg tödlich sein oder dauerhafte Schädigungen hervorrufen.
2. Man sollte ihn mit überschaubarem finanziellen Aufwand und in militärisch ausreichenden Mengen aus dem vorhandenen Material produzieren können.
3. Er sollte unter den Produktions- und Aufbewahrungsbedingungen sowie beim Transport und Einsatz als Waffe stabil sein.
4. Man sollte ihn mit den vorhandenen Techniken, Ausrüstungen und Munitionen effizient verbreiten können.
5. Er sollte auch nach der Verbreitung mittels militärischer Munition stabil überdauern.

nen ausreichend großen Anteil der Zielbevölkerung impfen, um eine Ausbreitung der Krankheit zu verhindern.

Unter den bakteriellen Krankheiten wurden Milzbrand, Pest, Brucellose, Tularämie, Rotz und Melioidose als mögliche Biowaffen ins Spiel gebracht. Die Eigenschaften dieser Erreger sind in Tabelle 23.1 zusammengefasst. Auch verschiedene Viren wurden vorgeschlagen, die teilweise tropische Krankheiten wie Denguefieber und Gelbfieber verursachen, aber auch aufkommende Krankheiten wie Lassafieber und Ebola. Als einzig beständige Wahl scheinen jedoch Pockenviren infrage zu kommen.

Als effektive Biowaffen wurden verschiedene Viren, Bakterien und Toxine genannt. Diese wurden vom CDC (Centers for Disease Control, USA) nach ihrer Risikostufe in drei große Kategorien eingeteilt.

Milzbrand

Milzbrand oder Anthrax ist eine Infektionskrankheit von Rindern, mit der sich auch Menschen leicht infizieren. Hervorgerufen wird sie durch das Bakterium *Bacillus anthracis*. Dieses lässt sich relativ problemlos in Kultur züchten. Das Bakterium bildet Sporen, die

Tabelle 23.1 Vom CDC (Centers for Disease Control, USA) aufgelistete Erreger und Kampfstoffe mit Bedeutung als Biowaffen

Kampfstoffe der Kategorie A: Die hierzu gehörenden Organismen stellen eine Gefährdung da, weil sie:	
<ul style="list-style-type: none"> • leicht von Mensch zu Mensch ausgebreitet oder übertragen werden können • eine hohe Sterblichkeit bewirken • in der Öffentlichkeit Panik und gesellschaftlichen Aufruhr auslösen • zum Schutz der öffentlichen Gesundheit besondere Maßnahmen erforderlich machen 	
Bakterien	
Milzbrand	<i>Bacillus anthracis</i>
Pest	<i>Yersinia pestis</i>
Tularämie	<i>Francisella tularensis</i>
Viren	
Pocken	<i>Variola major</i>
Filoviren	Marburg-Fieber Ebola (hämorrhagisches Fieber)
Arenaviren	Lassafieber Juninvirus (argentinisches hämorrhagisches Fieber)
Toxine	
Botulinustoxin aus <i>Clostridium botulinum</i>	
Kampfstoffe der Kategorie B: Die hierzu gehörenden Kampfstoffe	
<ul style="list-style-type: none"> • breiten sich mittelschwer aus • verursachen mittelschwere Krankheiten und eine geringe Sterblichkeit • erfordern fortschrittliche Diagnosefähigkeiten und Kontrollen 	
Bakterien	
Brucellose	<i>Brucella</i> (mehrere Arten)
Rotz	<i>Burkholderia mallei</i>
Melioidose	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
Q-Fieber	<i>Coxiella burnetii</i>
mehrere durch Nahrung und Trinkwasser übertragene Darmkrankheiten wie:	<i>Salmonella</i> (Salmonellose), <i>Shigella dysenteriae</i> (Bakterienruhr), <i>Vibrio cholerae</i> (Cholera)
Viren	
Alphaviren	Venezolanische Pferdeenzephalomyelitis Östliche und Westliche Pferdeenzephalomyelitis
Toxine	
Ricin (Gift des Wunderbaumes, <i>Ricinus communis</i>)	
Epsilonotoxin von <i>Clostridium perfringens</i>	
Enterotoxin B von <i>Staphylococcus</i>	
Kampfstoffe der Kategorie C:	
Aufkommende Krankheitserreger, die für eine massenhafte Verbreitung in der Zukunft gentechnisch modifiziert werden könnten, wie Nipah-Virus, Hantaviren, Flaviviren (Gelbfieber, Denguefieber), multiresistente Tuberkulose	

selbst unter widrigen Bedingungen überleben, unter denen die meisten anderen Bakterien absterben. Die Sporen können im Boden jahrelang überdauern und dann bei Kontakt mit einem geeigneten tierischen Opfer auskeimen. Man unterscheidet drei Hauptformen der Krankheit: Hautmilzbrand, eine Infektion der Haut, ist nur selten gefährlich. Bei **Lungenmilzbrand** werden die Sporen mit der Atemluft aufgenommen; diese Form ist durch eine hohe Sterblichkeit gekennzeichnet. Darmmilzbrand kommt relativ selten vor und entsteht durch Aufnahme von Bakterien oder Sporen beim Verzehr von kontaminiertem Fleisch. Die Symptome von Milzbrand werden durch zwei Toxine hervorgerufen, die – wie in Kapitel 21 beschrieben – durch Gene auf dem Plasmid pOX1 codiert werden. In gewisser Weise ist Milzbrand die ideale Biowaffe: letal, hochgradig infektiös, kostengünstig zu produzieren und mit Sporen, die lange überdauern.

Problematisch an Milzbrand ist: Die Sporen sind so widerstandsfähig und langlebig, dass es fast unmöglich ist, sie nach Beendigung der Feindseligkeiten wieder loszuwerden. Während des Zweiten Weltkriegs führten die Briten auf der kleinen Insel Gruinard vor der Küste Schottlands Tests mit Milzbrand durch (an Schafen als Zielorganismen). Obwohl die Insel mit Brandbomben bombardiert und desinfiziert wurde, blieb sie hernach unbewohnbar; die Milzbrandsporen überdauerten im Boden sogar noch nach der Behandlung des Bodens mit Meerwasser und Formaldehyd im Jahr 1987.

Die ehemalige Sowjetunion konzentrierte sich in ihren Biowaffenlaboratorien vermutlich auf Milzbrand und Pocken. Für dieses Land mit seinen riesigen, sehr dünn besiedelten Gebieten bedeutete Milzbrand eine gute Wahl zur Abwehr potenzieller Übergriffe aus den stark überbevölkerten asiatischen Nachbarländern wie China oder Indien.

Milzbrand stellt in vieler Hinsicht eine der besten biologischen Waffen dar: letal, hochgradig infektiös, leicht zu produzieren und mit langlebigen Sporen.

Der Milzbrandanschlag in den USA im Jahr 2001

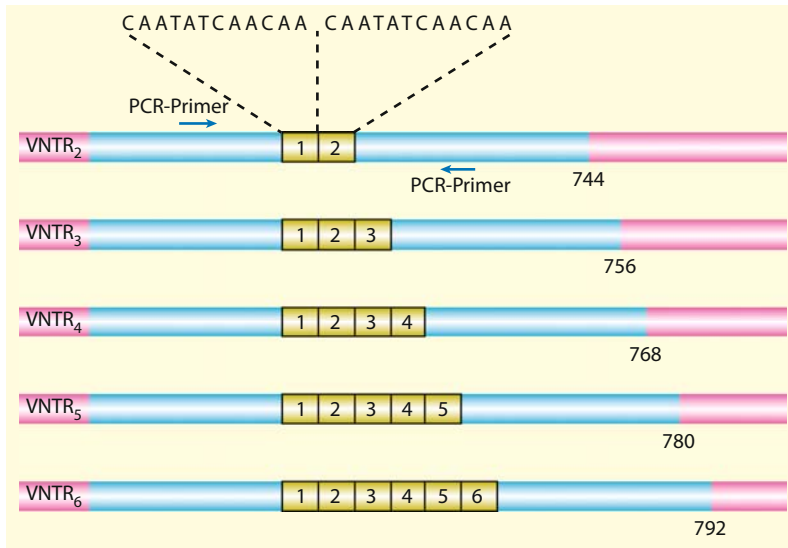
Kurz nach dem Terroristenanschlag auf das World Trade Center im September 2001 wurden über die

amerikanische Post Milzbrandsporen verbreitet. Dieser Milzbrandanschlag war in zweierlei Hinsicht bemerkenswert. Erstens fiel ihm nur eine Handvoll Menschen zum Opfer, was die Behauptung stützt, Biowaffen seien in der Praxis gewöhnlich gar nicht so wirkungsvoll. Zweitens rief er eine unverhältnismäßig übertriebene Reaktion hervor und verdeutlichte damit, wie wichtig die psychologischen Aspekte des Bioterrorismus sind. Die Überreaktion der Regierung und die öffentliche Panikmache richteten zweifellos weitaus mehr Schäden an als der Milzbrandanschlag selbst.

Die Milzbrandattacke kam von innerhalb der Vereinigten Staaten. Zwar ist der Fall zum Zeitpunkt der Niederschrift dieses Buches noch nicht gelöst, es scheint jedoch wahrscheinlich, dass es sich bei dem Täter um einen Insider der amerikanischen Biowaffenforschung handelte. Er verwendete den Ames-Stamm von *Bacillus anthracis*, der in den Laboratorien in den USA ziemlich verbreitet ist.

Will man die Herkunft von Milzbrandausbrüchen zurückverfolgen, so erweist sich als großes Problem, dass alle Stämme von *Bacillus anthracis* nahe miteinander verwandt und schwierig auseinanderzuhalten sind. So finden sich bei den verschiedenen Stämmen weder Abweichungen in der Sequenz der 16S rRNA noch in derjenigen der 23S rRNA. Die Analysen werden anhand von VNTRs (*variable number tandem repeats*) durchgeführt (für Details s. Kap. 24). So enthält beispielsweise das *vrRA*-Gen von *Bacillus anthracis* zwischen zwei und sechs Kopien der Sequenz CAATATCAACAA innerhalb der codierenden Region für ein Protein unbekannter Funktion (Abb. 23.4). Diese Sequenzwiederholungen entstanden vermutlich ursprünglich durch ein als Slippage bezeichnetes Verrutschen der DNA-Polymerase während der Replikation. Das Leseraster verändert sich durch die repeats nicht, aber es werden Wiederholungen der aus vier Aminosäuren bestehenden Sequenz Gln-Tyr-Gln-Gln im codierten Protein gebildet. Mittlerweile werden auch noch verschiedene andere VNTRs verwendet, darunter einige auf dem pOX1-Virulenzplasmid. Die größte Vielfalt an *Bacillus anthracis*-Stämmen stammt multiplen VNTR-Analysen zufolge aus dem südlichen Afrika, das deswegen als wahrscheinliche Heimat von Milzbrand gilt.

Verschiedene Stämme des Milzbranderreger haben eine identische rRNA-Sequenz. Anhand der Anzahl von VNTRs kann man sie unterscheiden.



23.4 Das *vrra*-VNTR von Milzbrand

Das *vrra*-Gen von Milzbrand (blau) enthält in der codierenden Region einen Abschnitt mit Sequenzwiederholungen. Zurückzuführen auf ein Verrutschen (Slippage) der DNA-Polymerase, weisen verschiedene Stämme des Erregers eine unterschiedliche Zahl von repeats auf (grün). Daher kann man sie durch einen Vergleich der Zahl der Sequenzwiederholungen zurückverfolgen. Mittels PCR wird dafür die Region mit den repeats amplifiziert. Anhand der Länge der PCR-Produkte kann man die Zahl der Repeats ermitteln.

Andere bakterielle Erreger

Yersinia pestis, der Erreger der Pest, rief im Mittelalter die berühmten Epidemien des „Schwarzen Tods“ hervor. Er ist hochgradig infektiös, verursacht hohe Sterberaten und führt sehr rasch zum Tod. Die Beulenpest wird durch Flöhe übertragen, die gefährlichere Form der Lungenpest direkt von Mensch zu Mensch über die Luft. Zur Zeit des Zweiten Weltkriegs war Pest als Biowaffe beliebt. Die Japaner testeten die Beulenpest an Gefangenen und versuchten auch in kleinerem Maßstab mit Pest infizierte Flöhe über die Luft nach China zu verbreiten. Dass sie damit kaum eine Wirkung erzielten, lag wohl unter anderem daran, dass die Pest in China bereits vorkam und sich schon auf natürliche Weise ausgebreitet hatte. Am britischen Biowaffenzentrum in Porton Down wurden noch einige Jahre nach dem Zweiten Weltkrieg in großem Umfang Kulturen der Pesterreger gezüchtet. Die Vereinigten Staaten unternahmen in den 1960er-Jahren offenbar den Versuch, die Pest unter Nagetieren in Vietnam, Laos und Kambodscha zu verbreiten, ebenfalls mit wenig Erfolg. Dass dies von offizieller Seite abgestritten wurde, bedarf keiner Erwähnung. Seitdem sind die Pesterreger anscheinend etwas aus der Mode gekommen.

Für die bakteriologische Kriegsführung kommen noch weitere Bakterien in Betracht. Die von *Brucella* hervorgerufene Brucellose betrifft Rinder, Kamele, Ziegen und verwandte Tiere. Als biologische Waffe wurde Brucellose von 1954 bis 1969 von den Verei-

nigten Staaten entwickelt, obgleich es etwas merkwürdig erscheint, dass die Wahl darauf fiel. Beim Menschen verhält sich diese Krankheit recht wechselhaft, sowohl was den Zeitraum bis zum Auftreten der Symptome als auch den Verlauf der Krankheit angeht. Infizierte Menschen erkranken häufig für mehrere Wochen, aber selbst unbehandelt verläuft die Krankheit nur selten tödlich. **Tularämie**, eine von *Francisella tularensis* verursachte Krankheit von Nagetieren und Vögeln, führt beim Menschen ohne entsprechende Behandlung zu einer Sterblichkeit von 5–10 %. Sie ist hochgradig infektiös und gilt im Allgemeinen als Krankheit, welche die Infizierten zwar außer Gefecht setzt, aber nicht unbedingt tödlich verläuft. Nach wie vor wird sie als mögliche Gefahr betrachtet. Die von dem Bakterium *Burkholderia pseudomallei* hervorgerufene Krankheit Melioidose ist mit Rotz (*Burkholderia mallei*) verwandt. Die Krankheit Rotz betrifft Pferde, Melioidose ist eine seltene Krankheit bei Nagetieren aus dem Fernen Osten und wird von Rattenflöhen übertragen. Trotz der Vorsilbe *pseudo*- im Namen des Erregers ist Melioidose infektiöser als Rotz und verläuft beim Menschen in 95 % der Fälle tödlich.

Pest führt zu einer ausgesprochen hohen Sterblichkeit, die Lungenpest kann direkt von Mensch zu Mensch übertragen werden. Tularämie verläuft selten tödlich, ist aber äußerst infektiös und setzt die Infizierten außer Gefecht. Beide Erreger kommen als potenzielle Biowaffen infrage.

Pockenvirus

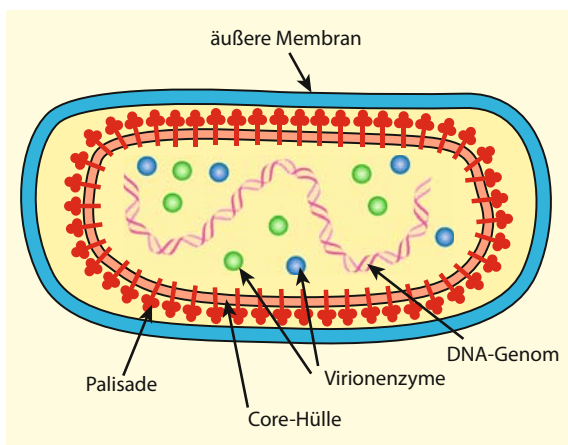
Der Erreger der Pocken ist ein Vertreter der Familie der **Pockenviren** (Poxviridae). Diese großen Viren enthalten eine doppelsträngige DNA (Abb. 23.5). Pockenviren sind die komplexesten Tierviren und aufgrund ihrer Größe sogar gerade noch mit dem Lichtmikroskop erkennbar. Sie messen ungefähr 0,4 mal 0,2 Mikrometer – im Vergleich zu 1,0 mal 0,5 Mikrometer bei Bakterien wie *E. coli*. Anders als alle anderen tierischen DNA-Viren, deren Replikation innerhalb des Zellkerns stattfindet, replizieren Pockenviren ihre dsDNA im Cytoplasma der Wirtszelle. Sie bilden subzelluläre Maschinerien, die man als Einschlusskörperchen bezeichnet und in denen die Viruspartikel hergestellt werden. Pockenviren haben ungefähr 185 000 Nucleotide, die für 150 bis 200 Gene codieren – etwa genauso viel wie die T4-Familie der komplexen Bakterienviren.

Das *Variola*-Virus infiziert nur Menschen. Das erlaubte der Weltgesundheitsorganisation WHO (World Health Organization), das Virus auszulöschen, was 1980 gelang. Pocken sind hochgradig infektiös und existieren in zwei Varianten: *Variola major* mit einer Sterblichkeitsrate von 30–40 % und

Variola minor mit einer Mortalität von rund 1 %. Die beiden Formen unterscheiden sich in etwa 2 % ihrer Basensequenzen. Ein verwandtes, aber recht schwaches Pockenvirus ist das *Vaccinia*-Virus, das als Lebendimpfstoff Verwendung findet. Es verleiht Immunität gegen mehrere nahe verwandte Pockenviren, darunter die eigentlichen Pocken und Affenpocken.

Für eine Industrienation bereitet die Präparation großer Mengen eines Virus, dessen Partikel recht stabil und langlebig sind wie bei Pocken, keine Probleme. Für ein Land der Dritten Welt könnte dies realisierbar sein. Ein potenzielles Szenario für Terroristen könnte so aussehen, dass freiwillige Selbstmordattentäter sich absichtlich infizieren und dann in dicht besiedelte Zielgebiete reisen. Dort mischen sie sich unter so viele Menschen wie möglich, indem sie an Massenergebnissen teilnehmen und in Großstädten mit der U-Bahn fahren.

Der Erreger der Pocken ist das am ehesten als Biowaffe einsetzbare Virus. Das Virus ist hochgradig infektiös, die Sterblichkeit kann 30–40 % betragen.



23.5 Pockenvirus

Sämtliche Pockenviren, darunter auch der Erreger der Pocken, sind in ihrer Struktur und DNA-Sequenz nahe verwandt. Ihr Genom besteht aus dsDNA, umschlossen von zwei Hüllschichten. Eine als „Palisade“ bezeichnete Proteinschicht ist in die Core-Hülle eingebettet. Vorgefertigte virale Enzyme sind ebenfalls in das Genom gepackt und ermöglichen sofort nach der Infektion eine Replikation. Pockenviren infizieren Tiere. Die äußere Virusmembran stammt von der Membran der vorherigen Wirtszelle.

Andere virale Erreger

Es wurden noch andere Viren als mögliche Biowaffen zur Diskussion gestellt, aber über keines ließ sich eine einhellige Meinung erzielen. Wie bereits erwähnt, benötigen Viren Wirtszellen, weshalb die meisten Viren nur schwer in großen Mengen zu kultivieren sind. Hinzu kommt, dass viele Viruspartikel sich bei längerer Aufbewahrung als instabil erweisen.

Filoviren wie das Ebola- und das Marburg-Virus sind eine Familie von Minusstrang-RNA-Viren, die lange, dünne Fäden bilden. Die Viren verteilen sich im Blutkreislauf und führen dazu, dass die Patienten Blut erbrechen. Ausbrüche des Ebola-Virus im Sudan und in der Demokratischen Republik Kongo haben zu einer Sterblichkeit von 80–90 % geführt. Es existieren jedoch auch zahlreiche nahe verwandte Virusstämme, die nicht annähernd so virulent sind. Beispielsweise kam es 1989 in einer Forschungsstation in Reston im US-Bundesstaat Virginia zu einem Ebola-Ausbruch bei Affen. Die infizierten Javaneraffen waren gerade erst von den Philippinen eingeführt worden. Dieser Fall erregte zwar ein enormes öffentliches Interesse, der Reston-Stamm des Ebola-

Virus erwies sich jedoch für den Menschen als nicht tödlich. Zudem kann man sich die meisten Filoviren nicht so einfach durch zufälligen Kontakt zuziehen, normalerweise muss man für eine Übertragung eng mit infizierten Körperflüssigkeiten in Kontakt kommen. Das macht sie in der Praxis zu relativ ungeeigneten Kandidaten für Biowaffen.

Denguefieber und Gelbfieber werden jeweils durch Vertreter der Familie der Flaviviren verursacht. Gelbfieber verläuft häufig tödlich, Denguefieber dagegen nur selten, es ist jedoch äußerst schmerzhaft und setzt die Opfer mehrere Tage lang außer Gefecht. Beide werden durch Stechmücken übertragen, was ihre mögliche Verwendung als Biowaffen stark einschränkt.

Lassafieber ist eine aufkommende Viruserkrankung, die erstmals Ende der 1960er-Jahre im Gebiet des Ortes Lassa in Nigeria auftrat. Das Lassa-Virus ist ein Vertreter der Familie der Arenaviren und enthält eine segmentierte, einzelsträngige RNA. Verbreitet wird es durch Nagetiere. Die Sterblichkeit bei Infektionen mit dem Lassa-Virus ist extrem hoch, sodass man das Virus vorübergehend auch als potenzielle Biowaffe ins Spiel brachte.

Mehrere andere Viren verursachen ähnlich wie das Pockenvirus eine hohe Sterblichkeitsrate. In den meisten Fällen bereitet es jedoch große technische Probleme, die Viren effizient zu verbreiten.

Gereinigte Toxine als Biowaffen

Als weitere Alternative zur biologischen Kriegsführung bietet sich der Einsatz von Toxinen anstelle von lebenden infektiösen Erregern an. Man kennt verschiedene Toxine, die man in ausreichenden Mengen aufreinigen könnte. Toxine werden von Bakterien, primitiven Eukaryoten wie Algen oder Pilzen, höheren Pflanzen und Tieren produziert (Tabelle 23.2).

Gereinigte, hoch effektive Toxine kommen ebenfalls als potenzielle Biowaffen infrage. Einige dieser Toxine stammen von Bakterien, andere aus Pflanzen oder Tieren, manche werden auch künstlich synthetisiert.

Botox – Botulinustoxin

Botulinustoxin (oder Botulinumtoxin) ist die giftigste bekannte Substanz. Produziert wird sie von dem Bakterium *Clostridium botulinum*, dem Erreger des Botulismus, einer schweren Form der Blutvergiftung. Es wurde als Biowaffe ins Gespräch gebracht, hat sei-

Tabelle 23.2 Als Biowaffen infrage kommende Toxine

Toxin	LD ₅₀ (µg/kg)	synthetisierender Organismus
Botulinustoxin A	0,001	Bakterium (<i>Clostridium</i>)
Enterotoxin B	0,02	Bakterium (<i>Staphylococcus</i>)
Ciguatoxin P-CTX-1	0,2	mariner Dinoflagellat
Batrachotoxin	2	Pfeilgiftfrosch
Ricin (RIP)	3	Wunderbaum (<i>Ricinus communis</i>)
Tetrodotoxin	8	Kugelfisch
VX	15	synthetisches Nervengift
Letaltoxin von Milzbrand	50	Bakterium (<i>Bacillus anthracis</i>)
Aconitin	100	Pflanze (Eisenhut, <i>Aconitum</i>)
Mycotoxin T-2	1200	Pilz (<i>Fusarium</i>)

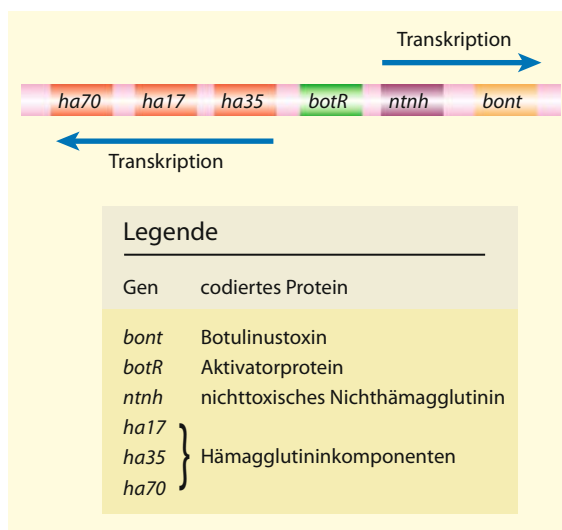
ne häufigste Anwendung jedoch unter dem Namen **Botox** in der Kosmetik gefunden. (Vielleicht besteht doch noch Hoffnung für die Menschheit!) Außerdem wird es zur Behandlung einiger Störungen verwendet, für die ein Muskelrelaxans benötigt wird.

Botulinustoxin ist ein **Neurotoxin** (Nervengift), das die Übertragung von Signalen von den Nerven zu den Muskeln blockiert und dadurch Muskellähmungen verursacht. Die unglaubliche Effektivität von Botulinustoxin ist auf seine enzymatische Wirkung zurückzuführen: Es wirkt als Zink-Proteinase und spaltet Proteine der neuromuskulären Endplatte, die für die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin erforderlich sind. Der Tod tritt im Allgemeinen durch Lähmung der Lungen und Versagen der Atmung ein.

Clostridium botulinum ruft fast nie Infektionen hervor, wächst aber gut in Lebensmittelkonserven, die nicht ausreichend sterilisiert wurden. In den kontaminierten Lebensmitteln reicht sich das Botulinustoxin an und kann dann bei Verzehr der Lebensmittel Botulismus verursachen. Die Bakterien sind weit verbreitet und oft in Spuren in der Nahrung enthalten. Problematisch wird es, wenn kontaminierte Nahrungsmittel nicht sterilisiert werden und unter Luftabschluss aufbewahrt werden, da sich *Clostridium* unter diesen anaeroben Bedingungen vermehren kann. Wird die Nahrung nicht ausreichend erhitzt (wodurch das Toxin zerstört wird), kann es zu einer Vergiftung kommen.

Botulinustoxin fehlt eine Leader-Sequenz, und es wird nicht sezerniert, sondern durch Lyse der Bakterien freigesetzt. Synthetisiert wird das Toxin in Form einer einzelnen, inaktiven Proteinvorstufe. Diese wird dann gespalten in eine schwere Kette (das Bindungsprotein, Molekülmasse ungefähr 100 000) und eine leichte Kette (das eigentliche Toxin, Molekülmasse ungefähr 50 000). Diese werden über Disulfidbindungen zusammengehalten.

Botulinustoxin wird in einem Komplex mit Hämagglutinin produziert, das zum Verklumpen (zur Agglutination) von roten Blutkörperchen und anderen assoziierten Proteinen führt. Die für diese Komponenten codierenden Gene befinden sich zusammengruppiert in zwei Operons, die in entgegengesetzter Richtung transkribiert werden (Abb. 23.6). Kontrolliert werden sie von dem Aktivatorgen *botR*, das zwischen den beiden Strukturgen-Operons liegt. Das Toxin-Gencluster findet sich je nach *Clostridium botulinum*-Stamm auf dem Chromosom, auf Plasmiden oder auf Bakteriophagen, die in das Chromosom integriert sind.



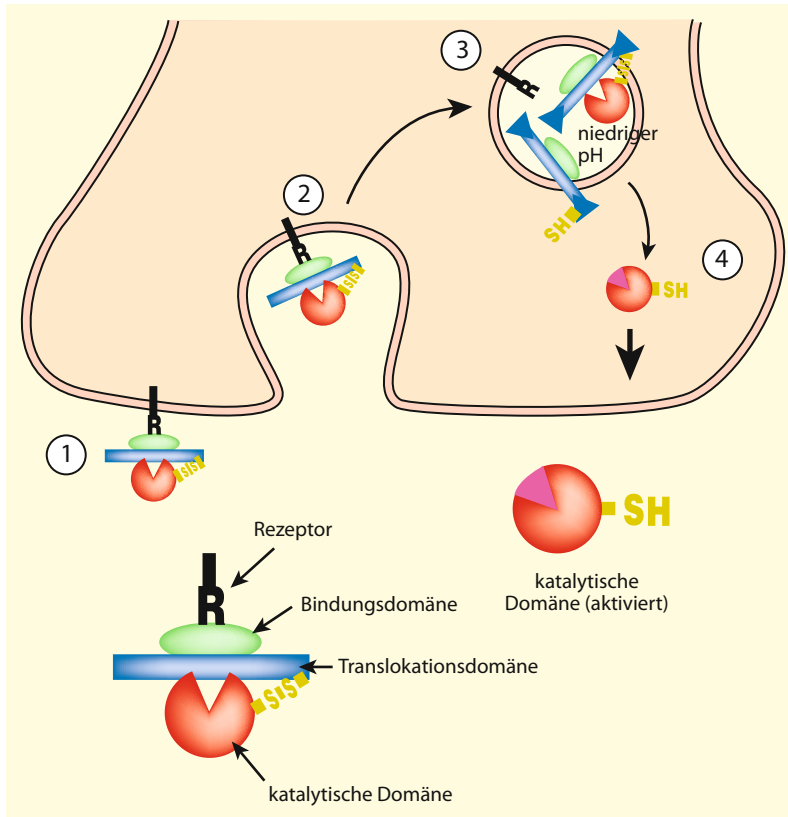
23.6 Das Botulinustoxin-Gencluster

Das BotR-Protein reguliert die Expression der beiden Operons und kontrolliert auf diese Weise die Expression des Botulinustoxins.

Das Toxin bindet sehr stark an die Synapsen peripherer Nerven, insbesondere an neuromuskuläre Endplatten, und blockiert die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin. Genauer gesagt bindet das Toxin an Rezeptoren in der Synapsenmembran und wird als Ganzes von einem Vesikel umschlossen aufgenommen (Abb. 23.7). An dieser Stelle kommt es zur Trennung der beiden Ketten. Wie für A-B-Toxine üblich, dringt nur die toxische Komponente (die leichte Kette) in das eukaryotische Cytoplasma ein, das Bindungsprotein (die schwere Kette) bleibt im Vesikel zurück.

Botulinustoxin ist eine Zn-abhängige Protease und spaltet die SNARE-Proteine, die an der Freisetzung von Acetylcholin durch die Synapse beteiligt sind. Genau genommen existieren mehrere verschiedene Varianten des Toxins, die von verschiedenen *Clostridium botulinum*-Stämmen produziert werden. Jede Toxinvariante wirkt auf eine andere Stelle eines der drei SNARE-Proteine (SNAP-25, Synaptobrevin und Syntaxin) ein. **Botulinustoxin vom Typ A** ist die Toxinvariante, die zu klinischen und kosmetischen Zwecken eingesetzt wird. Sie spaltet SNAP-25.

Terroristen der japanischen „AUM-Sekte“ (Omu Shinrikyo) haben Anschläge mit Botulinustoxin versucht. Zwischen 1990 und 1995 verteilten sie an verschiedenen Plätzen in Tokio und an amerikanischen Militäreinrichtungen in Japan Aerosole. Die



23.7 Aufnahme des Botulinustoxins

Die Aufnahme des Botulinustoxins an Nervenendigungen nach derzeitigem Kenntnisstand. 1) Das Toxin bindet an einem bislang noch nicht identifizierten Rezeptor an die Membran der Nervenzelle. 2) Es wird in einem Endocytosevesikel in die Zelle eingeschleust; im Inneren dieses Vesikels wird durch eine ATP-getriebene Protonenpumpe ein saures Milieu aufrechterhalten. 3) Bei niedrigem pH-Wert ändert das Toxin seine Konformation und baut sich in die Vesikelmembran ein. Die leichte Kette (rot) wird ins Cytosol freigesetzt. 4) Im Cytosol baut die leichte Kette eines der drei SNARE-Proteine ab.

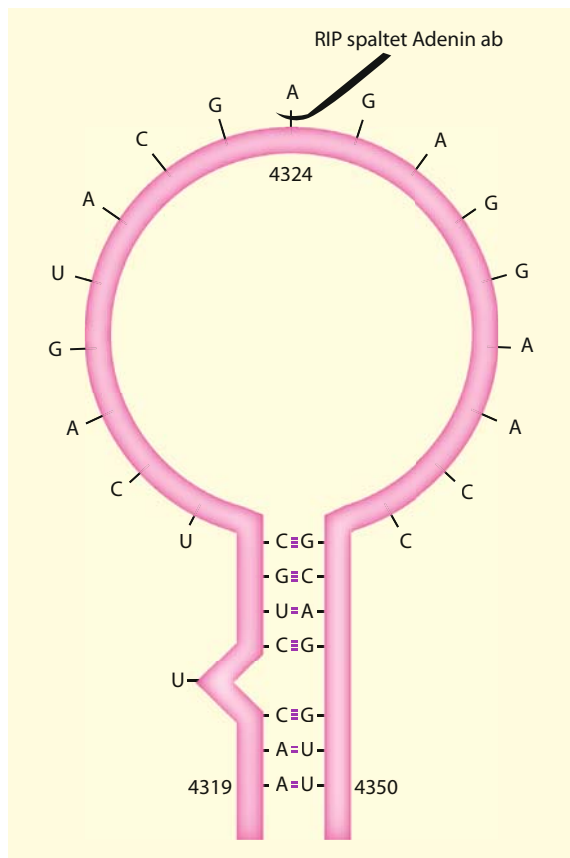
Anschläge schlugen jedoch fehl, weil die verwendeten Stämme von *Clostridium botulinum* kein Toxin produzierten.

Botulinustoxin hemmt die Muskelkontraktionen, durch die Falten und Runzeln entstehen. Zur Behandlung von mimisch bedingten Falten werden extrem verdünnte Lösungen von Botulinustoxin A (Botox) verwendet – vorausgesetzt, die Betroffenen können sich das leisten. Botox-Behandlungen kosten zwischen 300 und 600 Euro, die Wirkung hält aber nur etwa fünf Monate an. Diese Behandlungsform verzeichnet den schnellsten Zuwachs in der kosmetischen Medizin.

Botulinustoxin ist das stärkste bekannte Toxin und blockiert die Signalübertragung in den Nerven. Gelegentlich treten Fälle von Nahrungsmittelvergiftung auf. Heute wird das Toxin (Botox) verbreitet zu kosmetischen Zwecken eingesetzt, um Falten zu beseitigen.

Ribosomen-inaktivierende Proteine

Viele höhere Pflanzen produzieren **Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs)**. Diese spalten die N-glykosidische Bindung zwischen Adenin und Ribose und auf diese Weise Adenin von einer spezifischen Sequenz der großen Untereinheit der ribosomalen RNA (28S rRNA bei Eukaryoten, 23S rRNA bei Prokaryoten) ab. In der 28S rRNA von Ratten ist das Zielnucleotid Adenin 4324 (Abb. 23.8). Durch die Abspaltung des Adenins von der rRNA wird das Ribosom völlig inaktiviert. RIPs sind Enzyme und können daher zahlreiche nachfolgenden Reaktionen katalysieren. Folglich reicht ein einzelnes RIP-Molekül aus, um sämtliche Ribosomen zu inaktivieren und eine ganze Zelle abzutöten. Die Shiga-Toxine von *Shigella dysenteriae* (dem Erreger der Bakterienruhr oder Shigellose) und damit verwandte Toxine einiger pathogener Stämme von *E. coli* wirken nach demselben Mechanismus.



23.8 Wirkort der Ribosomen-inaktivierenden Proteine von Pflanzen

Die große Untereinheit des Ribosoms ist ein Komplex aus Proteinen und rRNA. RIPs erkennen diese ribosomale Untereinheit und spalten ein spezifisches Adennucleotid von der 28S rRNA-Komponente ab. Ohne das Adenin verliert das Ribosom seine Funktion.

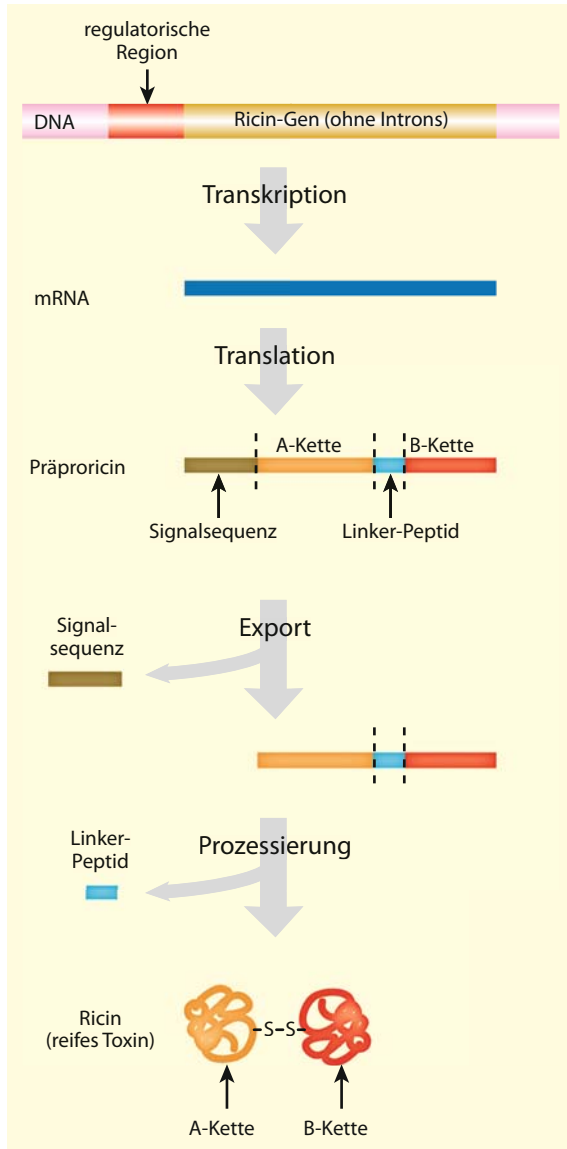
Das Ziel-Adennucleotid liegt in einer hochgradig konservierten Schleife in der Nähe des 3'-Endes der rRNA. Nach Abspaltung dieses einzelnen Adenins ist das Ribosom nicht mehr in der Lage, an den Elongationsfaktor 2 (EF-2) zu binden. Dadurch wird die Proteinsynthese unterbunden (zur Struktur und Aktivität der Ribosomen s. Kap. 2). Die RIPs greifen gereinigte rRNA von Bakterien und höheren Organismen an. Intakte Ribosomen von verschiedenen Organismengruppen sind jedoch ausgesprochen unterschiedlich empfindlich gegenüber RIPs. Bei weitem am anfälligsten sind die Ribosomen von Säugetieren. Insbesondere bei bakteriellen Ribosomen zeigen viele RIPs nur eine geringe oder vernachlässigbare Wirkung; aus diesem Grund konnte

man die Gene für einige RIPs in *E. coli* klonieren und exprimieren.

Man kann die RIPs in zwei Klassen unterteilen. Typ-I-RIPs bestehen aus einer einzelnen Proteinkette. Ihre Toxizität ist relativ gering, weil sie nicht effizient in Säugetierzellen eindringen können. Typ-II-RIPs bestehen dagegen aus zwei Ketten, A und B, und zählen zu den toxischsten Substanzen, die man kennt. Wie viele bakterielle Toxine (s. Kap. 21) vermittelt die A-Kette die toxische Enzymaktivität, die B-Kette das Eindringen in die Zielzelle. Das bekannteste Typ-I-RIP ist **Ricin**. Es wirkt schon in einer Dosis von 3 Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht letal – bereits ein halbes Milligramm reicht also aus, um einen erwachsenen Menschen zu töten. Noch zehnmal toxischer ist allerdings das weniger bekannte Abrin der Paternostererbse. Ricin erlangte 1978 internationale traurige Berühmtheit, als der bulgarische Dissident und Schriftsteller Georgi Markow auf offener Straße in London durch einen Ricinanschlag ermordet wurde. Der kommunistische Mörder verletzte Markow mit einem präparierten Regenschirm am Bein; dadurch wurde eine an der Spitze des Schirms angebrachte, mit Ricin gefüllte Metallkugel injiziert.

Die RIPs werden in Form von Vorstufen (Prä-RIPs) synthetisiert. Deren weitere Prozessierung erfolgt erst nach Verlassen des Cytoplasmas der Pflanzenzelle, in denen sie produziert wurden. Deshalb wirkt das Toxin für die Pflanze selbst nicht tödlich. Codiert wird Ricin durch ein einzelnes Gen und synthetisiert als einzelne Polypeptidvorstufe. Diese wird dann in zwei Stufen weiterprozessiert. Nach dem Export aus der Zelle erfolgt die Abspaltung der Signalsequenz vom N-Terminus. Danach wird ein dazwischenliegendes Linker-Peptid herausgeschnitten, sodass zwei kürzere Polypeptidketten übrig bleiben, die durch eine Disulfidbindungen zusammengehalten werden (Abb. 23.9). Die A-Kette weist große Ähnlichkeit zu den Typ-I-RIPs auf, die B-Kette ist ein **Lectin**. Dieses bindet an Galactosereste in Glykoproteinen der Zelloberfläche. (Lectine sind Kohlenhydrat-bindende Proteine von Pflanzen.)

Ricin wird aus den Samen des Wunderbaumes (*Ricinus communis*; Abb. 23.10) gewonnen. Dieser wird verbreitet als Zierpflanze und in großen Kulturen zur Gewinnung von Rizinusöl angepflanzt. Aufgrund seiner hohen Toxizität und Stabilität, weil es kein Gegengift gibt und weil das Ausgangsmaterial problemlos verfügbar ist, haben schon mehrere Extremistengruppen den Versuch unternommen, Ricin



23.9 Prozessierung von Typ-II-RIPs

Das Typ-II-RIP Ricin wird von einem einzelnen Gen codiert. Nach Transkription und Translation vermittelt die N-terminale Signalsequenz von Präproricin das Signal für den Export aus der Zelle. Durch Abspaltung der Signalsequenz entsteht Proricin. Das Proricin wird nach dem Export prozessiert, dabei wird das Linker-Peptid zwischen der A- und der B-Kette entfernt. Die A- und B-Ketten bleiben aber über eine Disulfidbindung verbunden und bilden das reife Toxin.

zu reinigen und einzusetzen. So gelang es beispielsweise 1991 im US-Bundesstaat Minnesota vier Mitgliedern der gegen die Regierung gerichteten Extremistengruppe „Patriot's Council“, Ricin zu Hause



23.10 Samen des Wunderbaumes (*Ricinus communis*)
Mit freundlicher Genehmigung von Dan Nickrent, Department of Plant Biology, Southern Illinois University, Carbondale, IL, USA.

in einem Labor zu reinigen. Wegen eines geplanten Mordanschlags mit Ricin auf einen Polizeidirektor wurden sie inhaftiert.

Bestimmte Pflanzen synthetisieren Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs). Diese inaktivieren die rRNA von Zielzellen und wirken besonders effektiv gegen Säugetierzellen. Das bekannteste Beispiel ist das Ricin des Wunderbaumes.

Gegen die Landwirtschaft gerichtete biologische Kriegsführung

Eine alternative Form der biologischen Kriegsführung ist die Vernichtung von Nahrungsmittelvorräten. Anstelle von pathogenen Mikroorganismen, die direkt den Menschen infizieren, werden in diesem Fall infektiöse Erreger eingesetzt, die auf Nutztiere oder -pflanzen abzielen. Die naheliegenden Ziele sind Nutzpflanzen, die Grundnahrungsmittel wie Getreide oder Kartoffeln liefern, denn Nutztiere ernähren sich ebenfalls von Pflanzen, und der Mensch kann auch auf eine vegetarische Ernährung umsteigen. Nutzpflanzen werden von vielen verschiedenen Krankheiten befallen, deren Erreger als Biowaffen eingesetzt werden könnten. Zahlreiche Pflanzenkrankheiten werden von primitiven Pilzen wie Rost-,

Brand- und Schimmelpilzen hervorgerufen. Ihre Sporen sind häufig hochgradig infektiös und werden durch den Wind oder durch Niederschläge verbreitet. In vielen Fällen gibt es keine effiziente Behandlungsmöglichkeit.

Beispiele für pathogene Pilze, welche die Ernte wichtiger Nahrungspflanzen vernichten können, sind unter anderem Sojabohnenrost (auch Asiatischer Rost) und Getreideschwarzrost. Bestimmte Pilze vernichten nicht nur die Ernte, sondern produzieren auch noch Toxine. Der auf Roggen oder anderem Getreide wachsende **Mutterkornpilz** produziert beispielsweise ein Gemisch aus Toxinen. Diese rufen ein als Ergotismus bezeichnetes Syndrom hervor, an dem Menschen und Nutztiere erkranken und sterben (Abb. 23.11). Selbst wenn nur geringe Teile einer Ernte befallen sind, muss die gesamte Ernte kontrolliert werden, was mit großen Störungen und wirtschaftlichen Verlusten einhergeht. Sporen pathogener Pilze könnten mit einem einzelnen Kleinflugzeug in der Luft verteilt werden. Eine andere Möglichkeit wäre die gezielte Infektion von Saatgut. So wird beispielsweise ein Großteil des in den Vereinigten Staaten ausgepflanzten Saatguts in anderen Ländern produziert und wäre damit vor dem Import zugänglich für eine potenzielle Kontamination. Die moderne Landwirtschaft ist aufgrund großflächiger Monokul-



23.11 Mutterkorn auf Quecke

Pilze wie der Mutterkornpilz (*Claviceps purpurea*) infizieren Getreidearten wie Weizen oder Roggen, aber auch Gräser wie die hier abgebildete Quecke. Der adulte Pilz bildet in den Ähren violett bis schwarz gefärbte Körperchen, die als Mutterkorn bezeichneten Sklerotien. Mit freundlicher Genehmigung von David Barker, Department of Horticulture and Crop Science, Ohio State University, Columbus, OH, USA.

turen, in denen genetisch identische Zuchtsorten in hoher Dichte angebaut werden, besonders anfällig für Biowaffen. Den angebauten Pflanzen fehlt die genetische Variabilität, die natürliche Populationen relativ resistent gegenüber Infektionen macht. Zudem erleichtert diese Form des Anbaus die rasche Ausbreitung von Infektionen. Der Einsatz von Biowaffen in der Landwirtschaft hat noch den weiteren Vorteil, dass die Erreger für den Menschen relativ harmlos sind und damit keine Gefahr für diejenigen darstellen, die diese anwenden.

Die Sporen hoch infektiöser Pilze könnten gezielt als Biowaffen gegen Nutzpflanzen statt gegen Menschen eingesetzt werden.

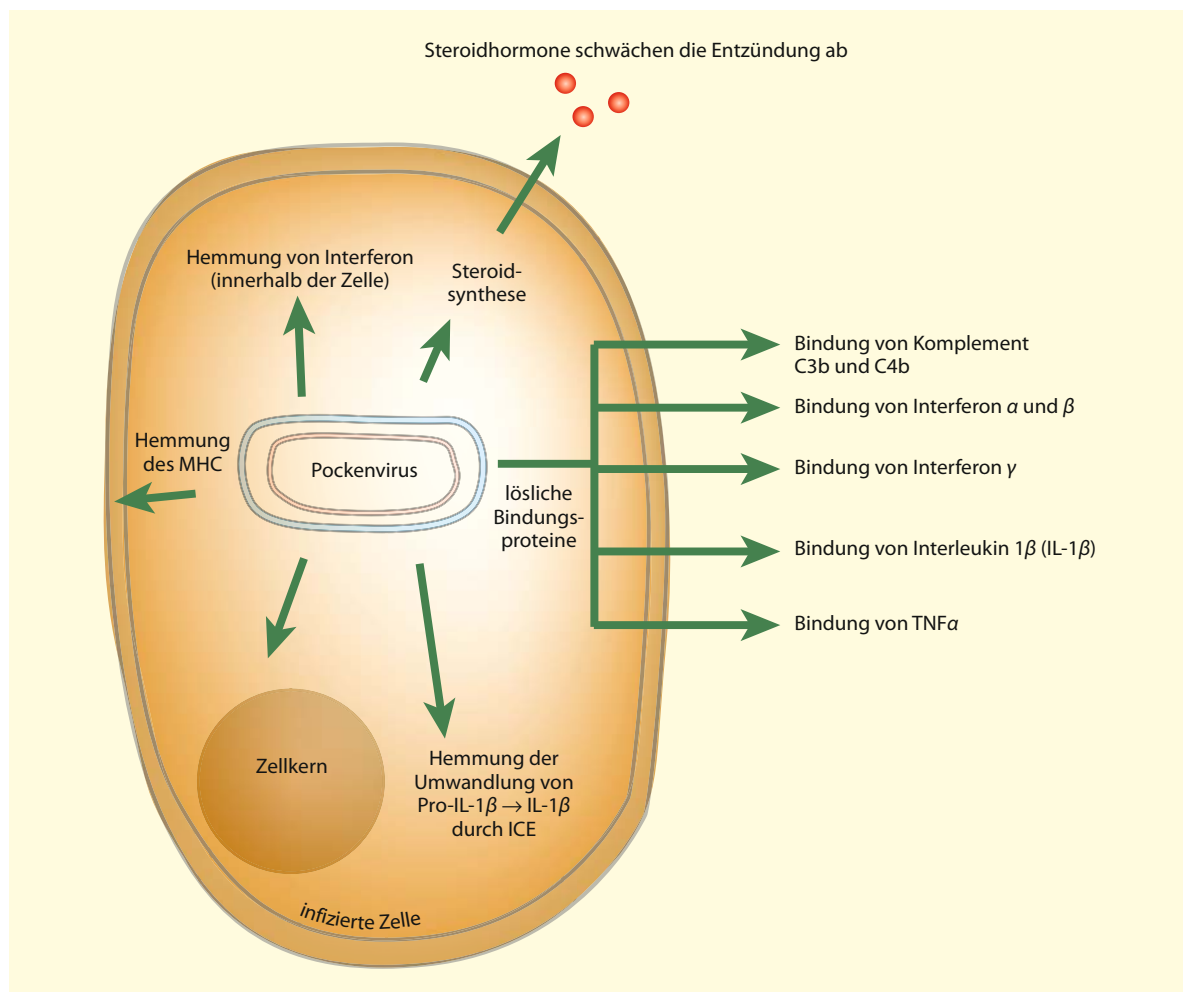
Gentechnische Modifikation infektiöser Erreger

Es wurde schon oft darauf hingewiesen, dass man durch gentechnische Veränderung noch gefährlichere Versionen infektiöser Erreger erzeugen könnte. An dieser Behauptung ist zwar durchaus etwas Wahres dran, häufig wird aber auch ziemlich übertrieben. Angenommen, man nähme ein harmloses Laborbakterium wie *E. coli* und würde dieses modifizieren. Man könnte die Bakterien so verändern, dass sie nach Aufnahme in die Darmwand von dort aus in andere Zellen eindringen. Mittels weiterer Gene könnte man dafür sorgen, dass sie den Blutzellen wichtige Eisenvorräte entziehen. Schließlich könnte man noch Gene für starke Toxine hinzufügen, welche die menschlichen Zellen zum Absterben bringen. Damit würde man *Escherichia coli* sozusagen in seinen nahen Verwandten *Yersinia pestis* verwandeln, den Erreger der Pest; diese Krankheit existiert aber bereits und ist heute endemisch in Indien, China und Kalifornien!

Dass wir nicht alle Epidemien von Infektionskrankheiten zum Opfer fallen, liegt nicht daran, dass es keine gefährlichen Pathogene gäbe; es liegt an der heutigen Hygiene und vorsorglichen Impfprogrammen. Unter geeigneten Bedingungen sind bereits existierende Krankheiten durchaus in der Lage, die menschliche Bevölkerung zu dezimieren. Aus dieser Sicht stellt die gentechnische „Verbesserung“ von Krankheitserregern eine verhältnismäßig geringe Gefahr dar.

Es ist bekannt, dass die Biowaffenschmiede der Sowjetunion Pockenviren modifiziert und verschiedene künstliche Mutanten und Hybride erzeugt hat. Einzelheiten hierzu sind aber kaum in Erfahrung zu bringen. In jüngerer Zeit durchgeführte Versuche mit **Mäusepocken (Ektromelievirus)** haben zu besorgniserregenden Ergebnissen geführt. Das Virus ist mit dem Erreger der Pocken des Menschen verwandt, infiziert aber ausschließlich Mäuse. Seine Virulenz ist je nach Mäusestamm sehr unterschiedlich. Genetisch resistente Mäuse profitieren von einer zellvermittelten Immunität, nicht von Antikörpern. Natural-Killer-Zellen und cytotoxische T-Zellen vernichten mit Mäusepocken infizierte Zellen und beseitigen so das Virus aus dem Körper.

Wissenschaftler haben das Mäusepockenvirus durch Einbau des menschlichen Gens für das Cytokin **Interleukin 4 (IL-4)** modifiziert. IL-4 regt bekanntermaßen die Teilung von B-Zellen an, die Antikörper synthetisieren. Die Wissenschaftler erwarteten von dieser Modifizierung des Virus, dass IL-4 die Produktion von Antikörpern stimulieren und für eine verbesserte und ausgeglichene Immunantwort sorgen würde. In Wirklichkeit passierte jedoch das Gegenteil: Es entstand ein Virus mit enorm erhöhter Virulenz. Es tötete nicht nur sämtliche der genetisch resistenten Mäuse, sondern auch noch die Hälfte der zuvor gegen Mäusepocken geimpften Tiere. Durch die Expression des überschüssigen IL-4 wurde die Aktivität der NK-Zellen und der cytotoxischen T-



23.12 Wie Pockenviren das Immunsystem umgehen

Pockenviren machen sich viele verschiedene Proteine zunutze, um zu verhindern, dass die infizierte Zelle vom Immunsystem des Wirtes angegriffen wird.

Zellen unterdrückt. Auch wurde die Antikörperreaktion nicht verbessert. Warum, weiß man bislang noch nicht genau, der Fall zeigt aber deutlich, dass das Immunsystem einer äußerst komplexen Kontrolle unterliegt.

Ähnliche Resultate ergaben sich mit Stämmen des *Vaccinia*-Virus, das zur Impfung verwendet wird. Ob ein Einbau von IL-4 oder anderen Immunregulatoren in das Pockenvirus selbst durch Untergraben der Immunantwort zu einer erhöhten Virulenz führen würde, weiß man nicht. Pockenviren besitzen bereits Gene, die ihrem Schutz dienen, indem sie die Wirkung von NK-Zellen und cytotoxischen T-Zellen beeinträchtigen (Abb. 23.12). Es handelt sich um die sogenannten **crm-Gene** (engl. *cytokine response modifier genes*), die bei verschiedenen Pockenviren unterschiedlich effektiv sind. Ein Grund für die starke Virulenz der Pockenviren könnte somit sein, dass sie bereits die zellvermittelte Immunantwort des Körpers unterdrücken. In diesem Fall wäre bei zusätzlichem IL-4 nur eine geringe oder keine weitere Zunahme der Virulenz zu erwarten.

Durch gentechnische Modifikation wurde die Virulenz bestimmter Pockenviren erhöht. Ob diese Methode auch beim Erreger der Pocken des Menschen funktionieren würde, ist nicht bekannt.

Erzeugen getarnter Viren

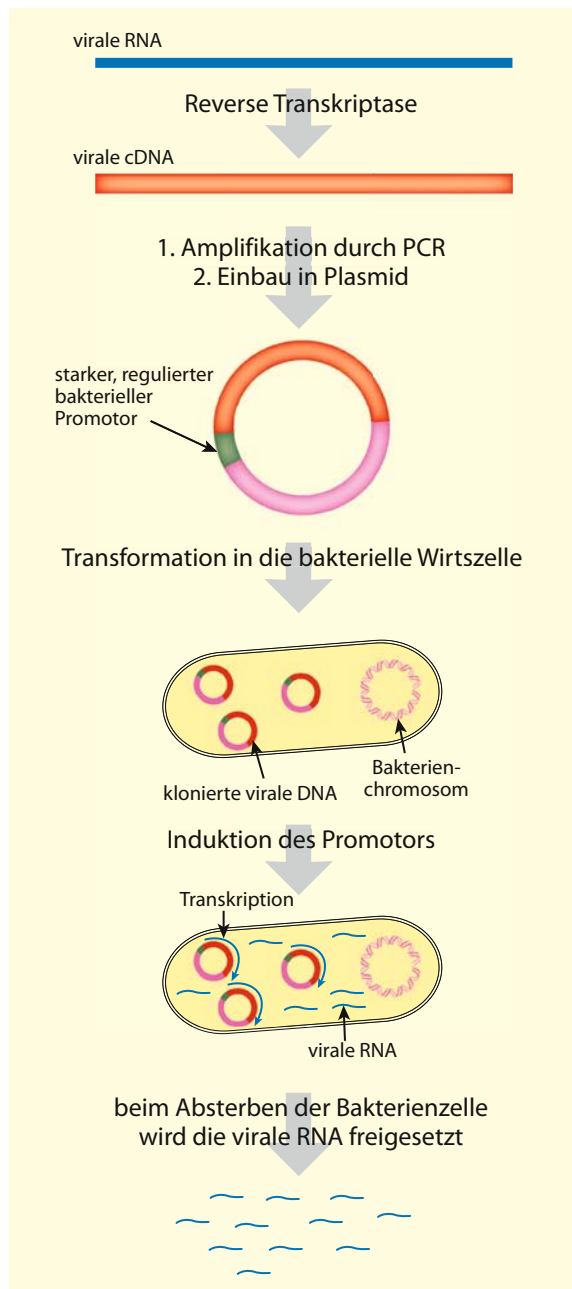
Eine weitere beunruhigende Errungenschaft der Gentechnik ist die Möglichkeit, ein potenziell gefährliches Virus in einem harmlosen Bakterium zu verstecken. Wirklich neu ist dies nicht, denn Bakteriophagen bauen ihr Genom von Natur aus in Bakterienchromosomen oder -plasmide ein und können nach Replikation, Zusammenbau und Freisetzung weitere Wirte infizieren. Mithilfe von molekularbiologischen Standardmethoden kann man das gesamte Genom eines kleinen Virus, das normalerweise Tiere oder Pflanzen infiziert, klonen und dann in ein Bakterienplasmid einbauen; auf diese Weise lässt sich ein pathogenes Virus praktisch in einem harmlosen Bakterium verstecken. Zur Aufnahme der Genome größerer Viren kann man anstelle von Plasmiden künstliche Bakterienchromosomen verwenden. Im Fall von RNA-Viren muss man vor der Klonierung in einen bakteriellen Vektor zunächst mithilfe von Re-

verser Transkriptase eine cDNA-Kopie des Virusgenoms erzeugen. Beim Klonieren ganzer Virusgenome stellen sich vor allem drei technische Probleme:

1. Die Genauigkeit der Reversen Transkriptase und der bei der PCR verwendeten Polymerase. Die ursprünglich verfügbaren Enzyme bauten zu viele Fehler ein. Heute sind jedoch Reverse Transkriptasen und PCR-Polymerasen verfügbar, die mit hoher Genauigkeit arbeiten. Dadurch können nun weitaus längere fehlerfreie RNA- oder DNA-Abschnitte erzeugt werden.
2. Geeignete Vektoren für große DNA-Inserts. Man hat Vektoren entwickelt, die extrem große Inserts aufnehmen können, beispielsweise künstliche Bakterien- oder Hefechromosomen (BACs, *bacterial artificial chromosomes*, bzw. YACs, *yeast artificial chromosomes*). Mit diesen kann man große Abschnitte eukaryotischer Genome klonieren und sequenzieren.
3. Bestimmte in Virusgenomen vorkommende Basensequenzen bleiben in den Plasmiden der bakteriellen Wirte nicht stabil erhalten oder werden nicht repliziert. Man bezeichnet diese als **poison sequences**. Beispielsweise konnte man die cDNA-Version des Gelbfieberevirus nicht in einem Stück klonieren; daher klonierte man sie in zwei Abschnitten, die separat in einem bakteriellen Wirt repliziert wurden. Um eine vollständige, funktionsfähige cDNA zu erzeugen, mussten die beiden Fragmente *in vitro* verknüpft werden. Bisweilen kann man dieses Problem durch Verwendung eines geeigneten *low-copy*-Vektors lösen.

Viele Zelltypen von Bakterien und Eukaryoten können unter bestimmten Bedingungen durch Transformation DNA oder RNA aufnehmen (s. Kap. 3). Folglich sind die nackten Nucleinsäuregenome vieler DNA- und RNA-Viren selbst ohne ihre Proteincapside infektiös. Nach Klonierung eines Virusgenoms kann man durch Replikation des Plasmids in einer bakteriellen Wirtszelle DNA-Moleküle erzeugen, die das Virusgenom enthalten. Solche DNA enthält zwar zusätzliche Plasmidsequenzen, kann aber dennoch infektiös sein, wenn sie in eine geeignete Wirtszelle transformiert wird.

Erstaunlicherweise gilt dies mitunter selbst für RNA-Viren – d.h. die cDNA-Version eines RNA-Virus kann erfolgreich Wirtszellen infizieren und eine neue Generation RNA-haltiger Viruspartikel entstehen lassen. Dazu muss die cDNA in den Zellkern der Wirtszelle eindringen und transkribiert werden, um eine RNA-Kopie des Virus zu erhalten. Die virale



23.13 Expression eines klonierten RNA-Virus

Zur Klonierung eines RNA-Virus muss man zunächst mithilfe von Reverser Transkriptase eine doppelsträngige DNA-Kopie herstellen. Diese cDNA wird dann in ein geeignetes Bakterienplasmid eingebaut und in die Bakterienzelle transformiert. Zur Kontrolle der Expression der viralen DNA wird strangaufwärts der viralen cDNA ein starker Promotor platziert. Bei einem induzierbaren Promotor muss das Bakterium nur den entsprechenden Reiz erhalten, und die virale cDNA wird exprimiert. Dies führt zur Produktion von Viruspartikeln, die viele Menschen infizieren können.

RNA durchläuft dann weiter ihren normalen Replikationszyklus. Gezeigt werden konnte dies an RNA-Viren wie dem Poliovirus, Influenzavirus und Coronavirus (einer der Erreger des grippalen Infekts).

Als bessere Strategie zur Erzeugung von RNA-Viren bietet sich an, die cDNA-Version ihrer Genome in ein Bakterienplasmid strangabwärts eines starken Promotors zu klonieren (Abb. 23.13). In diesem Fall wird durch Transkription die natürliche RNA-Version des Virusgenoms erzeugt. Das kann innerhalb der bakteriellen Wirtszelle unter Verwendung eines bakteriellen Promotors erfolgen. Alternativ kann auch ein eukaryotischer Promotor verwendet werden, um die Transkription der cDNA in virale RNA zu verbessern – nachdem die cDNA in die eukaryotische Wirtszelle eingeschleust wurde. Mit dieser Technologie kann man also Bakterien erzeugen, die auf ihren Plasmiden „versteckte“ Tierviren tragen. Unterstellt man die gesamte cDNA eines RNA-Virus der Kontrolle eines starken bakteriellen Promotors, so kann die Bakterienzelle intern durch Transkription große Mengen infektiöser viraler RNA erzeugen. Stirbt die Bakterienzelle ab und zerfällt, so wird die virale RNA freigesetzt. Würde man ein für den Menschen gefährliches RNA-Virus in ein harmloses Darmbakterium einschleusen – unter der Kontrolle eines Promotors, der auf die im Darm herrschenden Bedingungen reagiert –, so könnte dies eine ernsthafte Bedrohung darstellen.

Bestimmte RNA-Viren können in DNA-Formen umgewandelt und in Bakterienzellen eingebaut werden. Danach gibt es mehrere Möglichkeiten, um infektiöse Virenpartikel oder RNA zu erzeugen.

Biosensoren und der Nachweis von Biowaffen

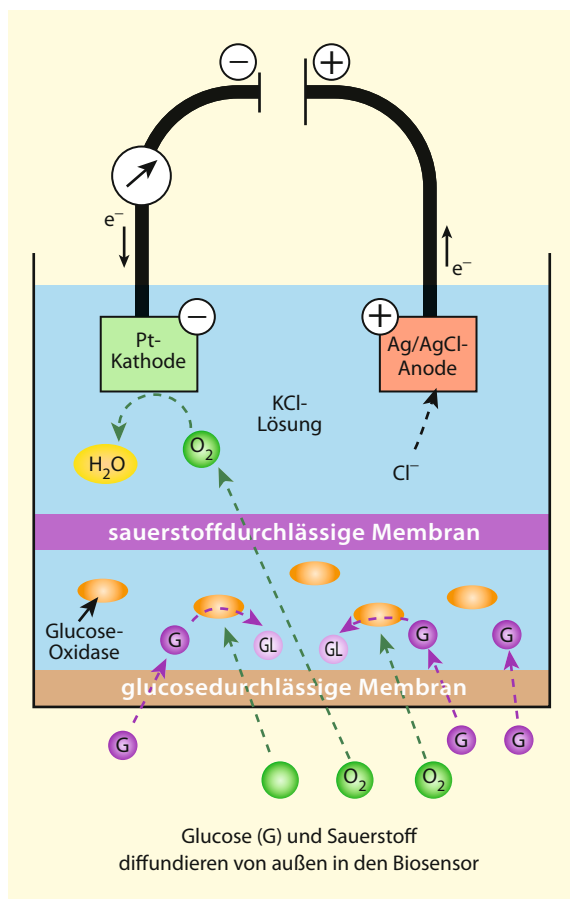
Biosensoren sind Geräte zum Nachweis und zur Messung von Reaktionen, die auf biologischen Mechanismen beruhen; häufig wird durch eine enzymatische Reaktion ein elektrisches Signal erzeugt. Bislang wurden Biosensoren in der klinischen Diagnostik sowie für Lebensmittel- und Umweltanalysen eingesetzt. Das bei weitem umfangreichste Anwendungsgebiet war die klinische Überwachung des Blutglucosespiegels mithilfe des Enzyms Glucose-Oxidase. Insbesondere für eine geeignete Behandlung von Diabetes ist

die genaue Kenntnis der Glucosekonzentration eine wesentliche Voraussetzung. Einer der Hauptgründe für die verbreitete Verwendung von Glucose-Oxidase ist ihre außerordentliche Stabilität. Das Enzym katalysiert die folgende Reaktion:



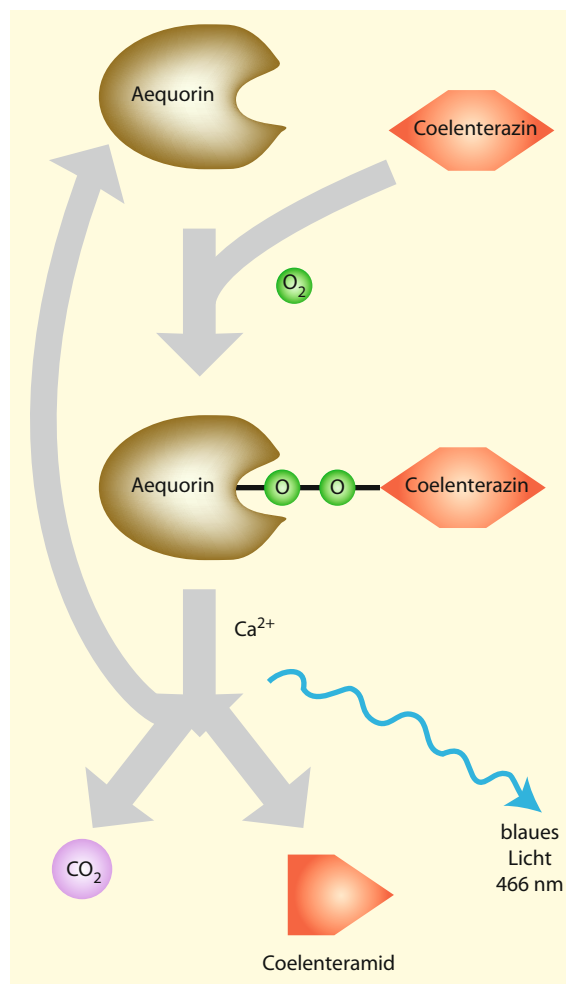
Der Glucose-Biosensor besteht aus einer dünnen Schicht Glucose-Oxidase, aufgebracht auf eine Sauerstoffelektrode (Abb. 23.14). Die Elektrode misst

den bei der enzymatischen Reaktion freigesetzten Sauerstoff. Der erzeugte Strom liefert ein Maß für die Glucosekonzentration. Zwischen der zentralen positiv geladenen Platinelektrode und der umgebenden negativ geladenen Silber/Silberchloridelektrode wird ein elektrisches Potenzial von ungefähr 0,6 Volt angelegt. Als Elektrolytlösung dient gesättigtes Kaliumchlorid. Die negativ geladene Elektrode (Kathode) ist mit einer dünnen Teflonmembran beschichtet, durch die Sauerstoff hindurchdiffundieren



23.14 Glucose-Oxidase-Biosensor

Dieser einfache Biosensor misst die Glucosekonzentration in einer Probe (in der Abbildung unten). Die Glucose- und Sauerstoffmoleküle diffundieren durch die Membran. Glucose (G) dringt nur in die untere Kammer ein, Sauerstoff kann in alle Kammern diffundieren. Glucose-Oxidase wandelt Glucose und Sauerstoff in δ -Gluconolacton (GL) und Wasserstoffperoxid um. Dadurch verringert sich die Sauerstoffkonzentration, welche die Kathode erreicht, was zu einer Veränderung der Spannungsdifferenz zwischen Kathode und Anode führt.

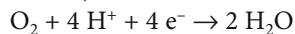


23.15 Lichtemission durch Aequorin

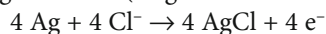
Das Protein Aequorin aus der Leuchtqualle *Aequorea victoria* emittiert bei Vorhandensein seines Substrats Coelenterazin sowie von Sauerstoff und Calcium blaues Licht. Das Enzym bindet über den Sauerstoff an Aequorin. In Anwesenheit von Calcium strahlt der Komplex blaues Licht ab, zersetzt das Substrat zu Coelenteramid und setzt Kohlendioxid frei.

kann, andere Moleküle, die reagieren könnten, werden abgehalten. Folgende Reaktionen finden an den Elektroden statt:

Platinkathode (Aufnahme von Elektronen)



Ag/AgCl-Anode (Abgabe von Elektronen)

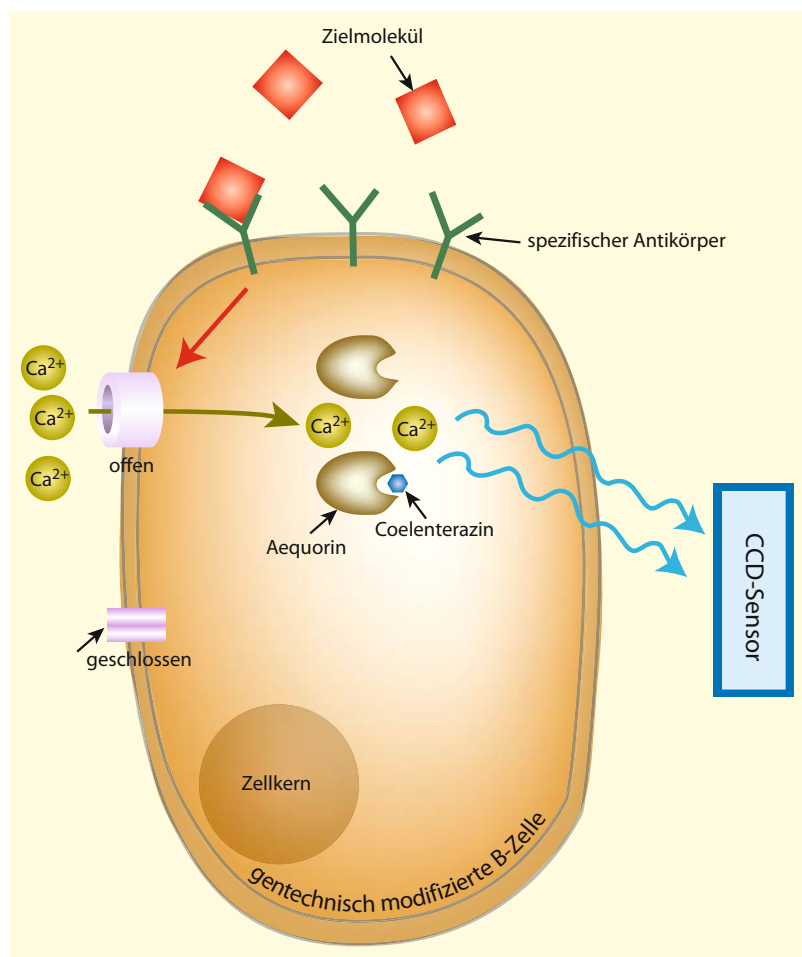


Mittlerweile besteht ein zunehmendes Interesse daran, Biosensoren zum Nachweis von Toxinen, Viren und möglicherweise weiteren Agenzien mit Biowaffenpotenzial einzusetzen. Besonders nützlich wäre ein handliches kleines Gerät, das ein schnelles Ergebnis liefert. Mehrfach wurden Vorschläge unterbreitet, spezifische Antikörper oder Antikörperfragmente als Detektoren für Biowaffen zu nutzen (s. Kap. 6).

Jede B-Zelle trägt für ein Antigen spezifische Antikörper. Daher wurde beispielsweise vorgeschlagen,

ganze B-Zellen für den Biosensor zu verwenden. Die Bindung eines Antigens an den Antikörper auf der Oberfläche einer B-Zelle löst eine Signalkaskade aus. Man hat gentechnisch B-Zellen hergestellt, die **Aequorin** exprimieren, ein Licht emittierendes Protein aus der Leuchtqualle *Aequorea victoria*. In Anwesenheit von Calciumionen emittiert Aequorin blaues Licht (Abb. 23.15). Lebende Leuchtqualen geben blaue Lichtblitze ab, die durch das berühmte grün fluoreszierende Protein (GFP) in grünes Licht verwandelt werden.

Würde eine B-Zelle in einem Biosensor einen Krankheitserreger (oder irgendeinen anderen gesuchten Mikroorganismus) feststellen, so würde die Zelle aufgrund der Aktivierung einer Signalkaskade Calciumionen abgeben (Abb. 23.16). Dadurch wiederum würde die Lichtemission von Aequorin ausgelöst. Das emittierte Licht könnte mittels eines lichtempfindlichen CCD-Sensors (engl. *charge-*



23.16 Optischer Biosensor mit B-Zellen

Durch Expression von Aequorin in B-Zellen würde man ein Detektionssystem für die Aktivierung von B-Zellen erhalten. Die Bindung eines Auslösermoleküls, etwa eines als Biowaffe eingesetzten Erregers, an Rezeptoren auf der B-Zelle bewirkt die Öffnung der Calciumkanäle, sodass Calcium in die Zelle einströmt. Durch die hohe Calciumkonzentration würde Aequorin aktiviert und blaues Licht abstrahlen. Mittels eines CCD-Sensors könnte man die Lichtemission messen und vor einer potenziellen Biowaffe warnen.

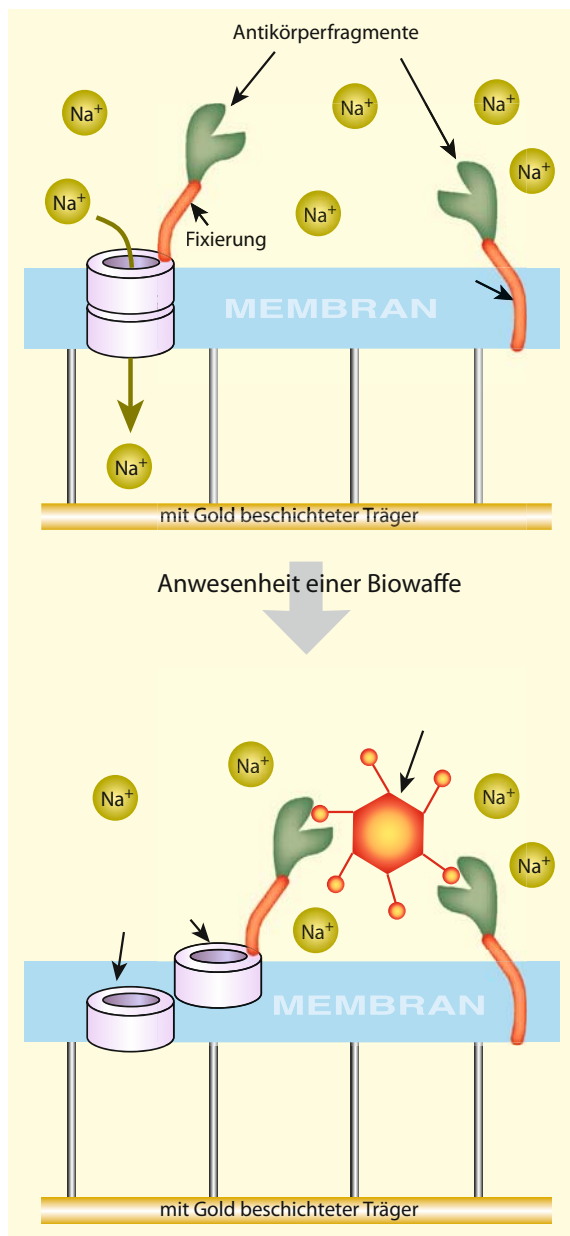


Abb. 23.17 Antikörper-Ionenkanal-Biosensor

Man kann Antikörperfragmente herstellen, die spezifisch Biowaffen binden, und diese dann an einer künstlichen Membran fixieren. Ein weiteres Fragment des gleichen Antikörpers wird an einen Natriumkanal gebunden. Dann bringt man die künstliche Membran auf einen mit Gold beschichteten Träger auf, der als Elektrode fungiert. Diese erkennt Natriumionen, die den Ionenkanal passieren. In Anwesenheit einer Biowaffe binden die Antikörperfragmente daran und ziehen die obere Hälfte des Kanals zur Seite, sodass keine Verbindung mehr zur unteren Hälfte besteht. Daher können nun keine Natriumionen mehr zur Goldelektrode passieren, und das Signal schwächt sich ab.

coupled device) gemessen werden. Zurzeit befindet sich diese Methode noch im Entwicklungsstadium. Letztendlich wird man damit fünf bis zehn Partikel von Krankheitserregern wie Viren oder Bakterien nachweisen können. Dazu würde man rund 10 000 für verschiedene Pathogene spezifische B-Zellen in Array-Form auf einen einzigen Chip aufbringen.

Eine andere Methode wird von der Ambri Corporation in Australien entwickelt. Hierfür werden Antikörperfragmente auf eine künstliche biologische Membran aufgebracht; diese wird an einen festen Träger gebunden, der mit einer Goldelektrode beschichtet ist. In der Membran sind Kanäle für Natriumionen enthalten. Bei geöffneten Ionenkanälen strömen Natriumionen durch die Membran und erzeugen in der Goldelektrode einen Strom. Die Ionenkanäle bestehen aus zwei Modulen, die jeweils die halbe Membran durchspannen. Bei Vereinigung des oberen und unteren Moduls ist der Kanal geöffnet. Durch die Bindung von Biowaffen an die Antikörperfragmente wird das obere Modul zur Seite weggezogen; dadurch werden die beiden Hälften der Kanäle voneinander getrennt, und der Kanal wird funktionsunfähig, was sich wiederum auf das elektrische Signal auswirkt (Abb. 23.17).

► Weiterführende Literatur

- Domaradskij IV, Orent LW (2006) Achievements of the Soviet biological weapons programme and implications for the future. *Rev Sci Tech* 25: 153–161
- Fang Y, Rowland RR, Roof M, Lunney JK, Christopher-Hennings J, Nelson EA (2006) A full-length cDNA infectious clone of North American type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Expression of green fluorescent protein in the Nsp2 region. *J Virol* 80: 11 447–11 455
- Fokin SI (2004) Bacterial endocytobionts of ciliophora and their interactions with the host cell. *Int Rev Cytol* 236: 181–249
- Halverson KM, Panchal RG, Nguyen TL, Gussio R, Little SF, Misakian M, Bavari S, Kasianowicz JJ (2005) Anthrax biosensor, protective antigen ion channel asymmetric blockade. *J Biol Chem* 280: 34 056–34 062
- Jeblick J, Kusch J (2005) Sequence, transcription activity, and evolutionary origin of the R-body coding plasmid pKAP298 from the intracellular parasitic bacterium *Caedibacter taeniospiralis*. *J Mol Evol* 60: 164–173
- Li Y, Sherer K, Cui X, Eichacker PQ (2007) New insights into the pathogenesis and treatment of anthrax toxin-induced shock. *Expert Opin Biol Ther* 7: 843–854
- Neumann G, Kawaoka Y (2004) Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA

- viruses entirely from cloned cDNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 283: 43–60
- Osborne SL, Latham CF, Wen PJ, Cavaignac S, Fanning J, Foran PG, Meunier FA (2007) The Janus faces of botulinum neurotoxin: Sensational medicine and deadly biological weapon. *J Neurosci Res* 85: 1149–1158
- Paterson RR (2006) Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycol Res* 110: 1003–1010
- Pinton P, Rimessi A, Romagnoli A, Prandini A, Rizzuto R (2007) Biosensors for the detection of calcium and pH. *Methods Cell Biol* 80: 297–325
- Prentice MB, Rahalison L (2007) Plaque. *Lancet* 369: 1196–1207
- Puissant B, Combadière B (2006) Keeping the memory of smallpox virus. *Cell Mol Life Sci* 63: 2249–2259
- Sliva K, Schnierle B (2007) From actually toxic to highly specific – novel drugs against poxviruses. *Virology* 4: 8
- Stirpe F (2004) Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44: 371–383
- Trull MC, du Laney TV, Dibner MD (2007) Turning biodefense dollars into products. *Nat Biotechnol* 25: 179–184
- van Belkum A (2007) Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbio* 49: 22–27

Forensische Molekularbiologie

Die genetische Grundlage der Identität

Blut, Schweiß und Tränen

Forensische DNA-Tests

DNA-Fingerprinting

Verwendung von Sequenzwiederholungen beim Fingerprinting

Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Tests und Wahrscheinlichkeit

Die Zulassung von DNA-Beweisen

Genealogische Forschungen mittels mitochondrialer DNA und Y-Chromosomen

Identifizierung der sterblichen Überreste der russischen Zarenfamilie

Weiterführende Literatur

Die genetische Grundlage der Identität

Für die DNA-Technologie gibt es zahlreiche praktische Anwendungsmöglichkeiten. Da jedes Individuum eine einzigartige DNA-Sequenz aufweist, kann man DNA-Proben zur individuellen Identifizierung nutzen. Mittlerweile werden DNA-Beweise auch vor Gericht zur Feststellung von Schuld oder Unschuld verwendet. Erstmals angewendet wurde die DNA-Technologie Mitte der 1980er-Jahre in Großbritannien, kurz darauf dann auch in den Vereinigten Staaten. Inzwischen haben zahlreiche Länder bereits DNA-Datenbanken (in Deutschland die DNA-Analysedatei, DAD) bekannter Krimineller erstellt, insbesondere von solchen, die schwere Straftaten begangen haben. Am häufigsten werden DNA-Nachweise jedoch nach wie vor zur Aufklärung umstrittener Vaterschaften eingesetzt.

Die Identität kann auch noch auf andere Weise festgestellt werden. Schon bei flüchtigem Hinsehen erkennt man wesentliche Unterschiede zwischen verschiedenen Menschen. Genetiker bezeichnen dieses äußere Erscheinungsbild als *Phänotyp*. Die meisten

körperlichen Unterschiede zwischen Menschen gehen auf komplexe Wechselwirkungen mehrerer Gene im Laufe der Entwicklung zurück. Manche davon sind auf den ersten Blick offensichtlich, bei anderen muss man schon genauer hinsehen. Das klassische Beispiel für einen im Gesetzesvollzug verwendeten Phänotyp sind Fingerabdrücke. Fingerabdrücke entstehen durch Variationen im Muster der Papillarleisten, kleiner Hautleisten an unseren Fingerbeeren. Das Muster der Fingerabdrücke wird durch mehr als ein Gen festgelegt (d.h. es ist **multigen**). Dadurch entsteht die enorme genetische Variabilität dieses Phänotyps. Selbst die Fingerabdrücke eineiiger Zwillinge sind nicht identisch, wie man vielleicht erwarten würde. Geringfügige Variationen der Fingerabdrücke sind auch durch Umweltfaktoren bedingt, die sich auf die Entwicklung auswirken. Bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts werden Fingerabdrücke zur Identifizierung von Personen herangezogen.

Die individuelle Identifizierung mithilfe von **Retina-Scans** ist technisch anspruchsvoller. Dabei macht man sich das einzigartige Muster der Blutgefäße der Netzhaut an der Hinterseite des Auges zunutze. So ein Scan dauert normalerweise eine Minute, weil man



24.1 Das Optibrand-System zum Scannen der Netzhaut von Rindern

Retina-Scans werden heute auch zur Identifizierung von Rindern verwendet. Mit freundlicher Genehmigung von Optibrand Ltd. LLC, Fort Collins, Colorado, USA.

mehrfach abtasten muss. Die Person wird mit dem Auge direkt vor dem Scanner platziert, sie muss den Kopf stillhalten und auf ein rotierendes grünes Licht fokussieren. Das Scannen erfolgt mit Infrarotlicht, weil die Blutgefäße der Netzhaut dieses besser absorbieren als das umgebende Gewebe. Mithilfe eines Computeralgorithmus wird das gescannte Bild dann in digitale Daten umgewandelt. Ein Retina-Scan liefert etwa zehnmal mehr Informationen als ein Fingerabdruck.

Früher wurden Retina-Scans überwiegend in Hochsicherheitseinrichtungen verwendet, beispielsweise von der CIA, vom FBI, von der NASA und in einigen Gefängnissen. Heute werden sie sogar zur Identifizierung von Tieren eingesetzt (Abb. 24.1). Der tragbare Scanner der Optibrand Corporation kommt vor allem bei Rindern zum Einsatz. Integriert ist ein GPS-System, das Zeitpunkt, Datum und Ort registriert. Mit dem Optibrand-System kann man einzelne Tiere identifizieren und über die gesamte Kette der Lebensmittelverarbeitung verfolgen. Besonders wichtig ist dies, wenn der Verdacht auf Rinderwahnsinn besteht und man die Herkunft solcher Tiere zurückverfolgen muss.

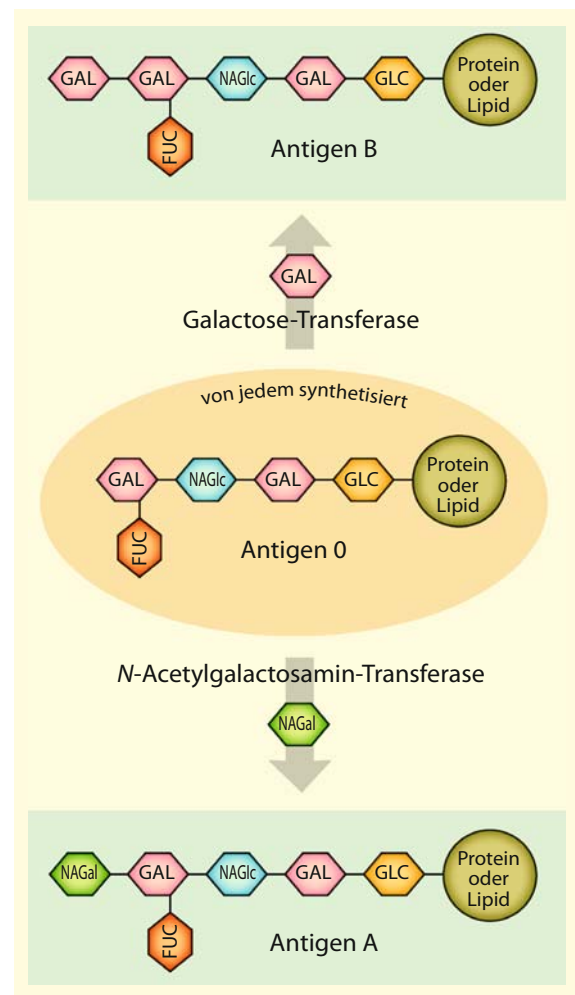
Weitere zur Identifizierung nutzbare Merkmale finden sich auf molekularer Ebene in Form von Proteinen und Polysacchariden. Ein gutes Beispiel für individuelle Unterschiede, an denen Proteine beteiligt sind, sind die verschiedenen Blutgruppen in menschlichen Populationen. Für eine endgültige Identifizierung auf molekularer Ebene muss man jedoch die Gene selbst analysieren und den Genotyp bestimmen. Dies bezeichnet man als DNA-Typisierung oder **DNA-Fingerprinting**; genauer beschrieben wird diese Technik weiter unten.

Bei Fingerabdrücken und Retina-Scans macht man sich extrem detaillierte biologische Daten zur Identifizierung einzelner Personen oder Tiere zunutze.

Blut, Schweiß und Tränen

Zur Feststellung der Identität kann man alle Arten von Körpergewebe und Körperflüssigkeiten verwenden. Die DNA-Technologie ist zwar noch relativ neu, aber eine logische Erweiterung der **Blutgruppenbestimmung**, die schon seit über 50 Jahren vor Gericht verwendet wird. Am häufigsten wird Blut analysiert, aber auch andere Körperflüssigkeiten wie Schweiß, Tränen, Urin, Speichel und Sperma enthalten Zellen mit Oberflächenproteinen, die man analysieren kann.

Die Zellmembran der roten Blutkörperchen enthält mehrere Proteine und Lipide mit angehängter Kohlenhydratkomponente, die an der Außenseite der Zelle exponiert ist. Diese wirken hochgradig antigen und werden bei der Blutgruppenbestimmung als **Blutantigene** bezeichnet. An diese Antigene binden höchst spezifisch Antikörper. Infolgedessen kann man zwei verwandte Blutantigene mit nur relativ geringen strukturellen Unterschieden dennoch auseinanderhalten, weil an sie unterschiedliche Antikörper binden.



24.2 Die Moleküle des ABO-Blutgruppensystems

Die Blutgruppe eines Menschen wird durch antigene Glykolipide festgelegt. Das Enzym *N*-Acetylgalactosamin-Transferase synthetisiert durch Anhängen von *N*-Acetylglactosamin an das Ende des O-Antigens das Antigen A. Galactose-Transferase hängt an das Ende des O-Antigens Galactose an und erzeugt so das Antigen B. Abkürzungen: NAGal = *N*-Acetylglactosamin, GAL = Galactose, NAGlc = *N*-Acetylglucosamin, FUC = Fucose, GLC = Glucose.

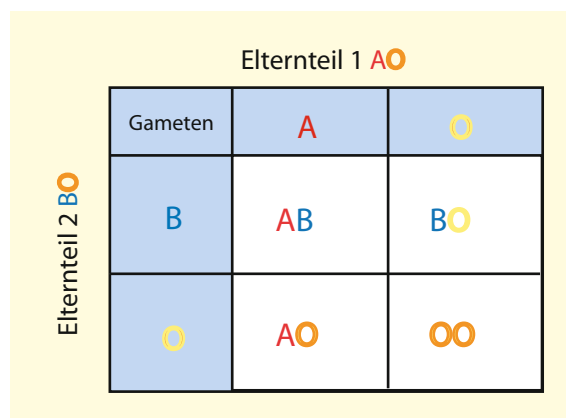
Zur Identifizierung werden routinemäßig mehrere Gruppen von Blutantigenen verwendet. Das bekannteste ist das **AB0-Blutgruppensystem**. Daran sind die drei Glykolipide A, B und 0 beteiligt; an dasselbe Lipid sind jeweils unterschiedliche Kohlenhydratstrukturen gebunden. Beim A-Antigen ist an das Ende des 0-Antigens *N*-Acetylgalactosamin angehängt, beim B-Antigen Galactose (Abb. 24.2). Gegen die Antigene A und B werden Antikörper produziert, das kürzere 0-„Antigen“ wirkt nur wenig antigen und bewirkt nur eine geringe Antikörperproduktion. Die nahe verwandten Enzyme, welche das A- und B-Antigen synthetisieren, werden von verschiedenen Allelen desselben Gens codiert. Fehlt dieses Enzym, so entsteht das 0-Antigen.

In der Bevölkerung liegen also drei Allele vor: A, B und 0. Weil jeder Mensch zwei Kopien jedes Gens aufweist, besitzt er auch zwei Allele für das AB0-System. Diese können entweder gleich oder verschieden sein. Die Allele für die Antigene A und B sind jeweils dominant. Wenn also zumindest ein Allel für A oder B vorhanden ist, wird dieses Antigen exprimiert (Tabelle 24.1). Bei Vorhandensein eines A- und eines B-Allels werden auf der Oberfläche der Blutzellen beide Antigene exprimiert (Blutgruppe AB).

Gegen die Antigene auf ihren eigenen roten Blutkörperchen bilden Menschen keine Antikörper. Jeder stellt nur Antikörper gegen fremde Antigene her, also gegen solche, die nur bei anderen Individuen vorhanden sind. Menschen mit Blutgruppe A exprimieren also Antikörper gegen das Antigen B, solche mit Blutgruppe B Antikörper gegen das Antigen A. Personen mit Blutgruppe 0 exprimieren Antikörper gegen Antigen A und Antigen B, Vertreter der Blutgruppe AB haben gar keine Antikörper (s. Tabelle 24.1). Erhält ein Mensch Blut der falschen Blutgruppe, so bewirken die eigenen Antikörper ein Verklumpen (Agglutination) der fremden Blutzellen. Menschen

mit Blutgruppe AB gelten als universelle Empfänger, weil sie auf keine der anderen Blutgruppen eine Reaktion zeigen. Umgekehrt sind Vertreter der Blutgruppe 0 universelle Spender, können selbst allerdings nur Blut der Blutgruppe 0 erhalten, weil sie sowohl gegen Antigen A als auch gegen B Antikörper bilden.

Weil Menschen zu den diploiden Organismen zählen, kann ein Kind eine andere Blutgruppe haben als seine Eltern. So bildet beispielsweise eine A0-Mutter Antigen A, ein B0-Vater Antigen B, dennoch kann ihr Kind die Blutgruppe 0 aufweisen, weil das Kind ein 0-Allel auf einem Chromosom der heterozygoten Mutter und ein weiteres 0-Allel vom heterozygoten Vater erben kann (Abb. 24.3).



24.3 Vererbung der AB0-Blutgruppen

Kinder von Eltern mit zwei verschiedenen Blutgruppen können auch eine ganz andere Blutgruppe haben als ihre Eltern. In diesem Beispiel besitzt Elternteil 1 die Allele für die Antigene 0 und A, Elternteil 2 die Allele für die Antigene B und 0. Nach Mendelscher Verteilung können ihre Kinder die Blutgruppen AB, B, A oder 0 haben, es sind also alle Möglichkeiten denkbar.

Tabelle 24.1 Das AB0-Blutgruppensystem

vorhandene Allele		exprimierte Blutgruppe	produzierte Antigene	Antikörper
A	A	A	A	anti-B
A	0	A	A	anti-B
B	B	B	B	anti-A
B	0	B	B	anti-A
A	B	AB	A und B	keiner
0	0	0	keines	anti-A und anti-B

Wer die Mutter eines Kindes ist, ist in der Regel bekannt. In den meisten Fällen ist es der Vater, der schwieriger festzustellen ist. Bei einer Vaterschaftsklage kann durch AB0-Blutgruppenbestimmung nur in rund 15–20 % der Fälle eine Vaterschaft ausgeschlossen werden. Betrachten wir den Fall einer Mutter mit Blutgruppe A, deren Tochter Blutgruppe AB hat. Damit steht fest, dass der Vater seiner Tochter das B-Allel vererbt haben muss. Also muss der Vater die Allelkombination B0, BB oder AB aufweisen; nicht möglich sind AA, A0 oder 00. Angebliche Väter mit den Blutgruppen A oder 0 kommen also nicht für die Vaterschaft infrage, nur Männer mit den Blutgruppen B oder AB. Da viele Menschen die gleiche Blutgruppe haben, reicht eine AB0-Blutgruppenbestimmung alleine nicht für eine sichere Überführung eines Schuldigen aus, kann aber beweisen, dass jemand unschuldig ist.

Es gibt noch mehrere andere Blut- und Gewebeanalyse-Systeme, die im Prinzip dem AB0-System ähneln und ebenfalls in der forensischen Medizin zum Einsatz kommen. Bei Verwendung des HLA-Systems der weißen Blutkörperchen (Lymphocyten) beträgt die Ausschlusswahrscheinlichkeit über 90 %. Durch eine Kombination von HLA- und AB0-System kann man die Ausschlusswahrscheinlichkeit auf 97 % steigern. Wenn man nun zusätzlich noch die Blutserumproteine analysiert, kann man Unschuldige mit ziemlicher Sicherheit ausschließen.

Anhand der folgenden Gleichung wird die kombinierte Wahrscheinlichkeit (P) eines Ausschlusses aus mehreren Tests mit den einzelnen Wahrscheinlichkeiten P1, P2, P3 und so weiter berechnet:

$$P = 1 - (1 - P_1) (1 - P_2) (1 - P_3) (1 - P_4) \text{ etc.}$$

Zur Blutgruppenbestimmung werden auf der Oberfläche der Blutzellen vorhandene Antigene identifiziert. Das häufig verwendete AB0-System unterscheidet innerhalb der menschlichen Bevölkerung drei verschiedene Allele.

besteht, dass die Blutprobe tatsächlich vom Verdächtigen stammt. DNA-Tests ermöglichen einen viel besseren Nachweis und liefern eine Wahrscheinlichkeit von nahezu 100 %.

Zwei Personen haben nie die gleiche DNA. Bei der Entwicklung der Gameten (Keimzellen) und der Befruchtung werden die einzelnen Chromosomen in so vielen verschiedenen Kombinationen auf die Nachkommen verteilt, dass es absolut unwahrscheinlich ist, dass zwei Personen die gleiche DNA aufweisen. Eine Ausnahme, die die Regel bestätigt, bilden eineiige Zwillinge, denn diese entstehen durch eine Teilung der Eizelle, die erst nach der Befruchtung erfolgt.

In manchen Fällen haben ausschließlich DNA-Tests, ohne weitere stützende Beweise, für eine Verurteilung ausgereicht, wenn es lediglich um die Identität ging. Zur Entlastung falsch identifizierter Personen, die fälschlicherweise für eine Straftat verurteilt wurden, reichen die Ergebnisse von DNA-Tests heute fast immer aus. DNA-Nachweise kann man von jedem Körpergewebe und jeder Körperflüssigkeit mit DNA-haltigen Zellkernen erhalten. Ob die am Tatort eines Verbrechens gefundenen DNA-Spuren mit denen des Verdächtigen oder des Opfers übereinstimmen, lässt sich vor allem mit zwei Tests überprüfen. Der eine Test wird volkstümlich als „genetischer Fingerabdruck“ (*DNA-Fingerprinting*) bezeichnet; der andere erfolgt durch eine Amplifikation mittels *Polymerasekettenreaktion* (PCR; *polymerase chain reaction*) mit anschließender Hybridisierung oder Sequenzierung. Von Verdächtigen entnommene Gewebeproben können mit Spuren verglichen werden, die am Tatort gesichert wurden.

Bei richtiger Durchführung kann man Personen mithilfe von DNA-Tests praktisch unzweifelhaft identifizieren.

Forensische DNA-Tests

Bei vielen Kriminalfällen wird als erster Nachweis die Blutgruppe bestimmt. Bisweilen wurden Verdächtige anhand der AB0-Blutgruppenbestimmung in Kombination mit anderen Blutantigenen verurteilt, obwohl nur eine Wahrscheinlichkeit von 25–50 %

DNA-Fingerprinting

Die Technik des DNA-Fingerprinting beruht auf dem charakteristischen Muster, das sich bei der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Länge durch Gelelektrophorese ergibt. Zunächst werden DNA-Proben verschiedener Verdächtigter, des Opfers sowie Proben vom Tatort des Verbrechens gereinigt. Mithilfe von Restriktionsenzymen

werden die Proben in Fragmente unterschiedlicher Länge gespalten. Folglich erhält man aufgrund der unterschiedlichen Schnittstellen verschieden lange Fragmente mit jeweils anderer Position auf dem Agarosegel. Unterschiedliche Muster zweier Individuen spiegeln somit Unterschiede in der Basensequenz ihrer DNA wider. Die Nucleotidunterschiede, die zu Fragmenten unterschiedlicher Länge führen, bezeichnet man als *Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen* (RFLPs; s. Kap. 3). Zwischen nicht-verwandten Personen tritt vermutlich alle 1000 Nucleotide eine Abweichung auf.

Das DNA-Fingerprinting umfasst die folgenden Schritte (Abb. 24.4):

1. Spaltung der DNA mit einem Restriktionsenzym.
2. Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Länge oder ihrer Molekülmasse durch Gelelektrophorese.
3. Sichtbarmachung der Fragmente durch Southern Blotting. Nach dem Transfer der aufgetrennten Fragmente vom Gel auf einen Nylonfilter wird eine radioaktiv markierte DNA-Sonde hinzugegeben. Diese Sonde bindet an komplementäre DNA-Fragmente.
4. Anschließend wird die Position der DNA-Fragmente, die mit der radioaktiven Sonde reagiert haben, durch eine Autoradiographie mit einem strahlungsempfindlichen Film auf dem Blot sichtbar gemacht.

Es stehen viele verschiedene Restriktionsenzyme mit zumeist charakteristischen Spaltungseigenschaften zur Verfügung. In der Praxis verwendet man für dieselbe DNA-Probe jeweils mehrere unterschiedliche Enzyme, sodass man für verschiedene Menschen jeweils andere Fragmente erhält. Diese kann man dann mit DNA-Proben vergleichen, die man beim Opfer oder am Tatort gesammelt hat. Aufgrund der großen genetischen Variabilität können die RFLP-Muster verschiedener Personen sehr stark voneinander abweichen. Selbst wenn ein geringer Prozentsatz der Zielsequenz in der Umgebung der Schnittstelle durch eine Mutation verändert wurde, wird noch genügend Ähnlichkeit vorhanden sein, sodass die Sonde bindet. Der gesamte Vorgang zieht sich über mehrere Wochen hin.

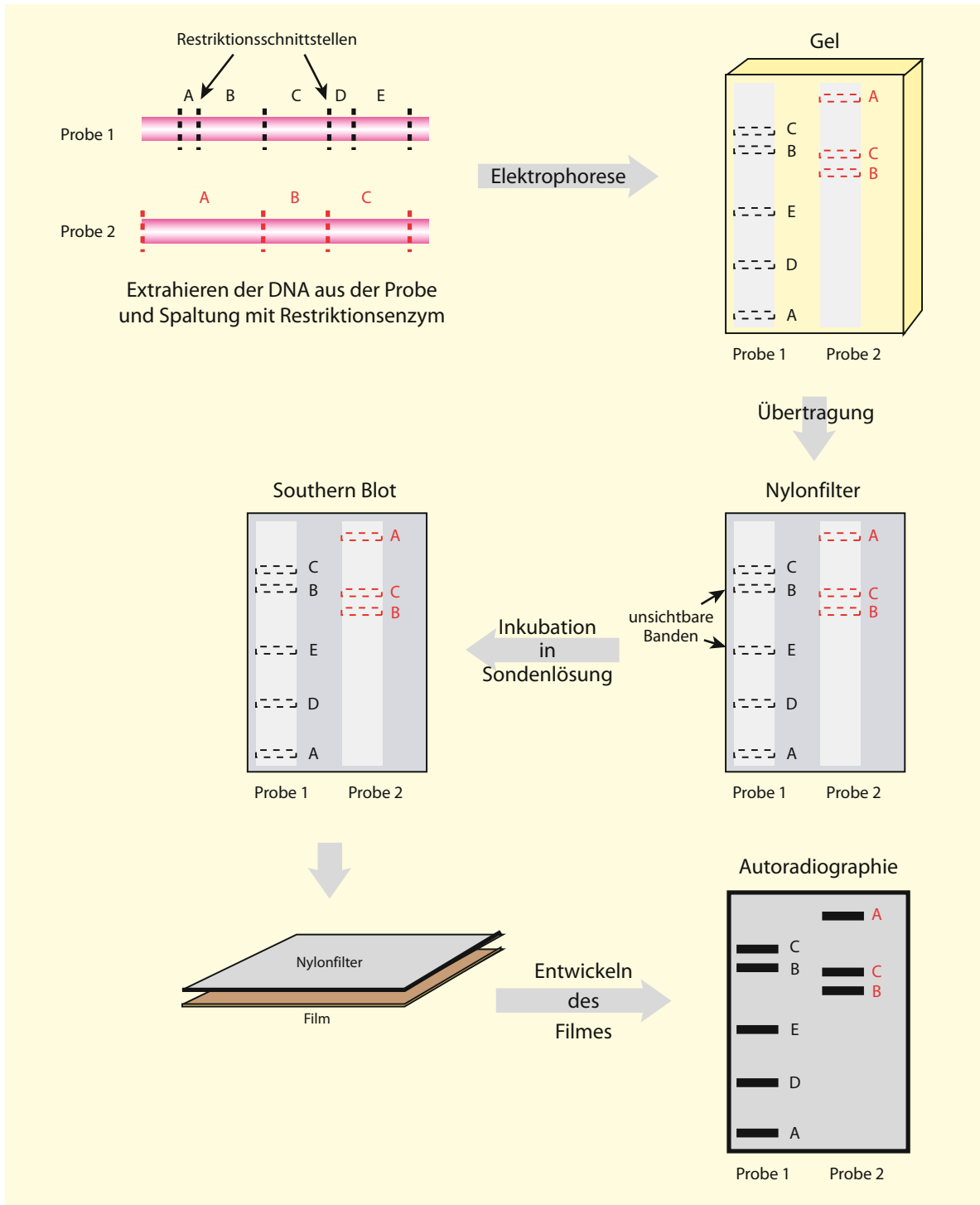
Das Endprodukt eines DNA-Fingerprintings ist eine Autoradiographie mit mindestens fünf Bahnen (Abb. 24.5). Als Marker dienen standardisierte DNA-Fragmente bekannter Größe, die radioaktiv markiert wurden. Mit deren Hilfe kann die Größe der verschiedenen Fragmente ermittelt werden. Als „Kontrolle“

verwendet man eine DNA aus einer Quelle, die nachweislich positiv und zuverlässig auf die DNA-Sonde reagiert und somit zeigt, ob der Versuch erwartungsgemäß funktioniert hat. Die übrigen Bahnen sind für Proben des Opfers, des Angeklagten und vom Tatort bestimmt. Im vorliegenden Beispiel wurde Blut von der Kleidung des Angeklagten mit dessen eigenem Blut und dem Blut des Opfers verglichen. Die DNA von den Blutspuren der Kleidung stimmt tatsächlich mit der des Opfers überein.

Zwei Varianten des DNA-Fingerprintings werden durchgeführt: die **SLP-Methode** (engl. *single-locus probing*) und die **MLP-Methode** (engl. *multi-locus probing*). Bei der SLP-Methode wird eine Sonde verwendet, die spezifisch für eine Stelle ist, also für einen einzigen Locus in der genomischen DNA. Da der Mensch diploid ist, ergeben sich bei einer SLP-Sonde normalerweise pro Person für jeden bestimmten Locus zwei Banden – vorausgesetzt der ausgesuchte Locus zeigt genügend allelische Variation. Gelegentlich werden auch homozygote Personen vorkommen, bei denen sich nur eine einzelne Bande ergibt. Für eine vollständige Identifizierung mit der SLP-Methode muss man mehrere Reaktionen durchführen und dafür jeweils eine andere SLP-Sonde verwenden. SLP-Analysen kommen mit geringeren Mengen Material aus als MLP-Analysen und sind leichter zu interpretieren und zu vergleichen. Mit SLP-Daten kann man beispielsweise statistische Analysen und Häufigkeitsanalysen in der Population durchführen.

Die MLP-Methode wurde bereits vor der SLP-Methode angewandt. Für eine MLP-Analyse verwendet man eine Sonde, die an mehrere Stellen (zahlreichen Loci) im Genom bindet. Infolgedessen erzeugt eine MLP-Sonde bei jedem Individuum mehrere Banden. Weil man nicht weiß, welche Bande von welchem Locus herrührt, ist das Ergebnis schwierig zu interpretieren. Darüber hinaus kann man auch keine statistischen Analysen durchführen und die Daten nicht zuverlässig in Computerdatenbanken speichern. Also muss man die durch MLP-Sonden erzeugten Fingerprints direkt mit anderen auf demselben Gel vergleichen. Aus diesem Grund ist die MLP-Methode weitgehend durch die SLP-Analyse ersetzt worden.

Die Methode des DNA-Fingerprinting beruht auf dem einzigartigen Muster, das sich bei verschiedenen Personen ergibt, wenn man DNA-Fragmente nach ihrer Länge auftrennt.

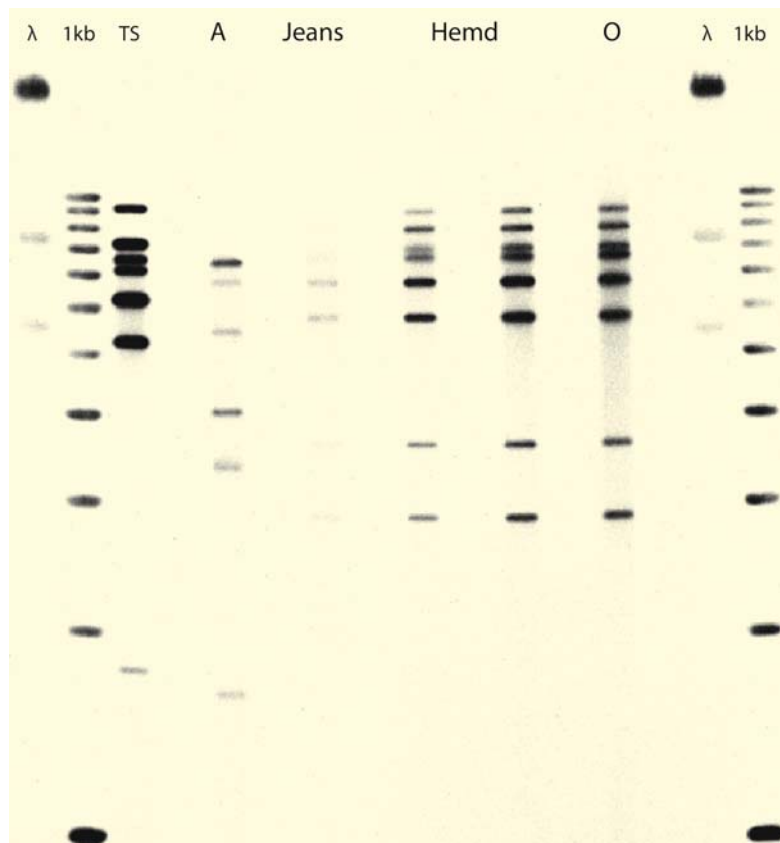


24.4 Skizze eines DNA-Fingerprintings

Beim DNA-Fingerprinting wird ein Muster aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erzeugt. Die DNA-Sequenz bestimmt, an welchen Stellen die Restriktionsenzyme spalten. Bei verschiedenen Menschen ergibt sich somit für das gleiche Restriktionsenzym ein unterschiedliches Fragmentmuster. Anhand dieser Unterschiede kann man einzelne Personen identifizieren.

24.5 DNA-Fingerprinting

Dieses Ergebnis eines DNA-Fingerprintings zeigt, dass das Muster der DNA-Fragmente des Opfers (O) auf der Kleidung des Beschuldigten (Jeans, Hemd) gefunden wurde. Die ersten beiden und die letzten beiden Bahnen sind Standardmarker (bezeichnet als λ und 1 kb). Die mit TS bezeichnete Bahn diente als positive Kontrolle, die zeigen sollte, dass das Fingerprinting funktioniert hat. Die mit A bezeichnete Bahn zeigt das DNA-Muster des Angeklagten. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Quick Publishing, LC.

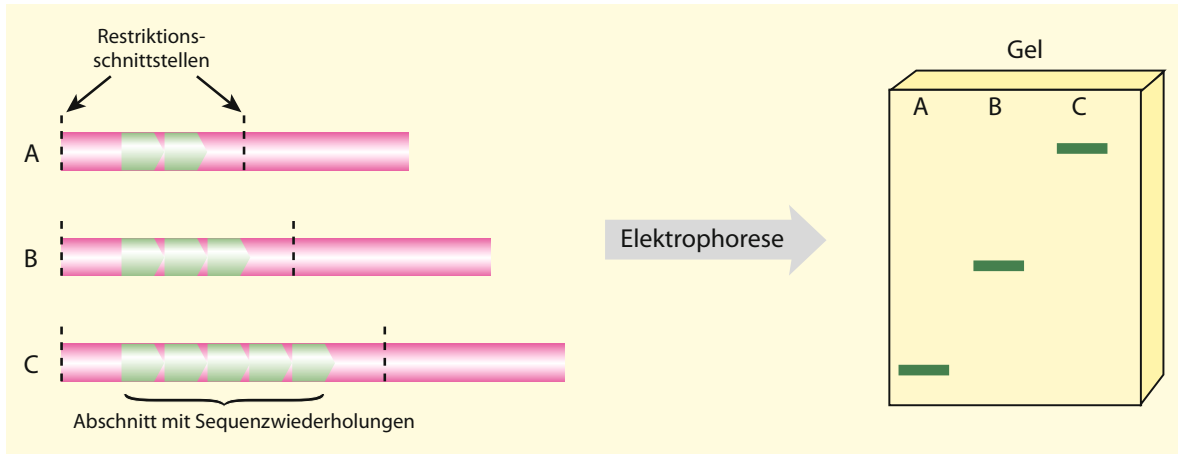


Verwendung von Sequenzwiederholungen beim Fingerprinting

Bei einer Variante des DNA-Fingerprintings konzentriert man sich auf DNA-Abschnitte, die sogenannte **VNTRs** (*variable number tandem repeats*) enthalten. Wie bereits in Kapitel 8 ausgeführt, bedeutet dies, dass bestimmte DNA-Sequenzen mehrere Male wiederholt vorliegen; verschiedene Menschen weisen eine unterschiedliche Zahl dieser Sequenzwiederholungen auf. Diese variieren stark in ihrer Länge. Für forensische Zwecke verwendet man heute jedoch im Allgemeinen relativ kurze Sequenzwiederholungen, die sogenannten **STRs** (*short tandem repeats*; s. weiter unten). VNTRs treten in der Regel in nichtcodierenden Abschnitten der DNA auf. Damit bleibt bei Verwendung von VNTRs die Privatsphäre gewahrt, weil die codierende DNA einer Person für die forensischen Analysen nicht offengelegt wird. Man kann

VNTRs sichtbar machen, indem man mit Restriktionsenzymen den DNA-Abschnitt herausschneidet, der das VNTR enthält, und anschließend – wie zuvor – die DNA-Banden durch Gelelektrophorese auf trennt und mittels Southern Blotting darstellt. Alternativ kann man die DNA-Fragmente für die VNTR-Analyse auch durch PCR erzeugen (s. weiter unten). Abbildung 24.6 zeigt entsprechende DNA-Fragmente von drei Personen, die sich in der Zahl der repeats innerhalb des gleichen VNTR unterscheiden. Folglich weist auch das Fragment bei jeder der Personen eine andere Länge auf.

Häufig ergibt sich bezüglich der Zahl der repeats eines bestimmten VNTR-Abschnitts eine enorme Variationsbreite bei verschiedenen Personen. Es besteht also eine äußerst geringe Wahrscheinlichkeit, dass zwei Menschen exakt übereinstimmen oder – wenn man so will – eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass sie sich unterscheiden. Von einigen VNTRs gibt es 100 bis 200 Varianten. Das macht sie zu idealen Untersuchungsobjekten für forensische Analysen. Auch wenn es sich bei den VNTRs um keine echten Gene



24.6 VNTR-Fingerprinting

Genomische DNA enthält Regionen mit Sequenzwiederholungen. Die Zahl dieser repeats ist von Person zu Person unterschiedlich. Daher kann man zur Feststellung der Identität die Längen dieser Regionen vergleichen. Mithilfe von Restriktionsenzymen wird der Abschnitt mit den repeats von den drei Personen isoliert (mit den Buchstaben A, B und C bezeichnet). Durch eine Agarosegelelektrophorese kann man dann die Längen der Fragmente ermitteln und vergleichen.

handelt, bezeichnet man ihre Varianten als Allele. VNTRs sind also „Multi-Allel-Systeme“.

Dadurch entsteht jedoch noch ein praktisches Problem: Multiple Tandem-repeats ergeben so viele dicht gepackte Banden, dass man die verschiedenen Fragmente mit einer normalen Agarosegelelektrophorese nicht unterscheiden kann. Mit anderen Gelen, etwa Polyacrylamidgelen, lassen sich nahe beieinander liegende Banden auftrennen. Als Alternative bietet sich die Auftrennung mit einem Gradientengel an.

Bei den ursprünglich von Alec Jeffreys 1985 in England entwickelten DNA-Fingerprintings wurden VNTRs mit langen Sequenzwiederholungen verwendet. Dazu wurde die DNA isoliert und mit Restriktionsenzymen gespalten, denn die PCR kannte man damals noch nicht. Von diesen Fragmenten wurden dann mittels MLP-Analyse die ersten DNA-Fingerprints erstellt.

STRs sind eine Unterkategorie der VNTRs mit nur zwei bis sechs Nucleotiden langen Sequenzwiederholungen. Die meisten STRs sind hinsichtlich der Zahl der repeats nicht ganz so variabel wie die VNTRs mit ihren längeren Sequenzabschnitten. Da von vielen STR-Sequenzen lediglich zehn bis zwanzig Allele existieren, reichen sie alleine nicht für eine eindeutige Identifizierung aus. Es sind jedoch zahlreiche STR-Loci vorhanden, deshalb erhält man bei gleichzeitiger Analyse mehrerer solcher Loci genügend Daten, dass sich für jede Person ein individuelles Mus-

ter ergibt. Heute erzeugt man die DNA-Fragmente für STR-Analysen mittels PCR (s. weiter unten).

Heute verwendet man für ein DNA-Fingerprinting Sequenzwiederholungen. In erster Linie werden STRs (*short tandem repeats*) genutzt, weil sich diese besonders gut analysieren lassen.

Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) kann man geringste Mengen DNA amplifizieren. Daher ist sie die Methode der Wahl, wenn man zu wenig DNA zur Verfügung hat oder die DNA für ein Fingerprinting bereits zu stark abgebaut ist. Die einzelnen Schritte der PCR wurden bereits in Kapitel 4 ausführlich erläutert. Mittels eines sogenannten Thermocyclers kann man einen DNA-Abschnitt (von 100 bis 3000 bp Länge) innerhalb weniger Stunden amplifizieren; als Ausgangsmenge reicht dafür ein Picogramm (10^{-12} g), besser geeignet sind jedoch Mengen im Mikrogrammbereich (10^{-6} g) oder mehr. Selbst die DNA einer einzigen Zelle kann man mithilfe der PCR analysieren.

Während man für das klassische DNA-Fingerprinting relativ lange DNA-Stränge benötigte, ist eine PCR auch mit kurzen DNA-Abschnitten durchführbar. Am besten eignet sich die PCR für DNA-Regionen mit hoher individueller Variabilität. Am besten amplifiziert man kleine Abschnitte, die von Person zu Person äußerst variabel sind. Stimmen die Sequenzen aus zwei Proben in mehreren höchst variablen Regionen überein, so stammen sie mit ziemlicher Sicherheit von derselben Person. Derzeit werden fast alle forensischen DNA-Analysen unter Verwendung der PCR-Methode durchgeführt.

Nach Amplifikation der DNA aus einer forensischen Probe mittels PCR vergleicht man sie mit der DNA von einem oder mehreren Verdächtigen. Dazu bringt man Spots beider DNA-Proben auf eine Membran auf und überprüft, ob sie an eine radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Sonde binden. Entweder erfolgt eine Bindung der Sonde oder nicht, jeder Spot kann also ein positives oder negatives Ergebnis liefern. Diese Testmethode bezeichnet man als *dot-blot*-Methode (Abb. 24.7). Der Hauptunterschied zwischen PCR und DNA-Fingerprinting besteht also darin, dass man beim DNA-Fingerprinting nach Unterschieden in den Fragmentgrößen sucht, während bei der PCR-Analyse auf das Vorhandensein oder Fehlen identischer (oder fast identischer) DNA-Sequenzen geschaut wird. Falls erforderlich, kann man die mittels PCR amplifizierten DNA-Abschnitte auch noch vollständig sequenzieren. Eine hierfür geeignete Methode ist die DNA-Array-Technologie (s. Kap. 8), denn diese ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer kurzer Sequenzen.

Man kann mehrere STR-Loci gleichzeitig analysieren, indem man unterschiedliche Primer verwendet; dadurch erfolgen im gleichen Reaktionsansatz mehrere PCR-Reaktionen (**Multiplex-PCR**; Abb. 24.8). Allerdings muss man darauf achten, dass sich die verschiedenen Primer nicht gegenseitig beeinflussen, was häufig nicht ganz einfach ist, wenn sechs oder mehr Amplifikationen zugleich stattfinden. Mittlerweile sind jedoch spezielle Kits erhältlich, mit denen man bis zu 13 STR-Analysen gleichzeitig in einem Reaktionsansatz ablaufen lassen kann. Durch eine solche Multiplex-Analyse erhält man ein Gel mit bis zu $2N$ Banden (wobei N die Zahl der analysierten Loci ist). Im genannten Beispiel würden 13 STR-Loci also 26 Banden ergeben. Weniger Banden entstehen bei Personen, die homozygot für einen der ausgewählten Loci sind. Auch wenn dies alles sehr komplex erscheint: Die verwendeten STRs stammen alle von bekannten Sequenzen an bekann-

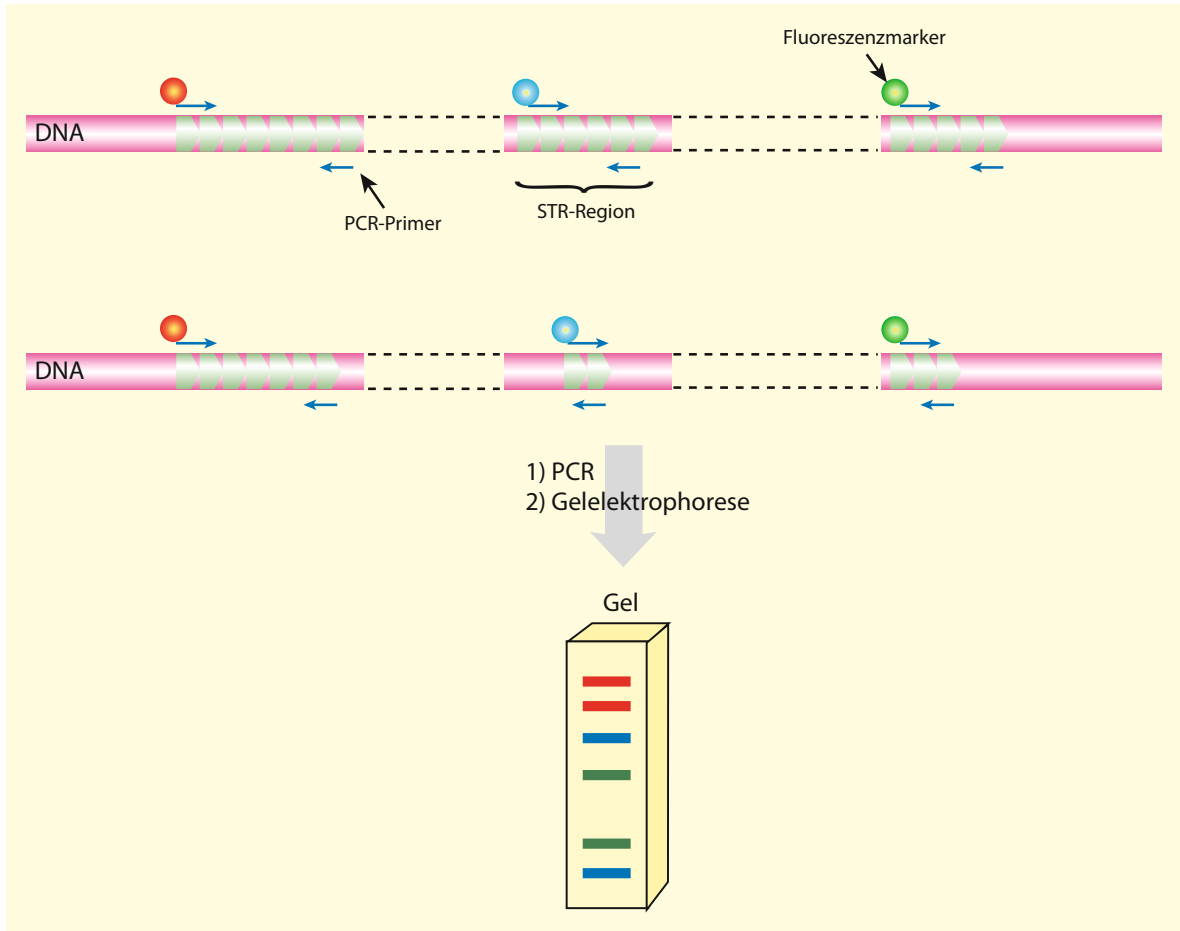
Sonde	Proben			
	A	B	C	D
1	●	○	●	●
2	○	●	○	○
3	●	●	●	○
4	○	○	○	●
	vom Tatort	Opfer	Verdächtiger	Kontrolle

24.7 Identifizierung mittels PCR und *dot-blot*-Methode

In diesem Beispiel wird verglichen, ob Spuren von einem Tatort mit Proben des Opfers oder des Verdächtigen übereinstimmen. Dazu wird zunächst die DNA des Opfers, des Verdächtigen und der Probe vom Tatort isoliert. Mittels PCR wird anschließend ein kurzer Abschnitt der DNA mithilfe von Primern, die eine Region mit hoher Variabilität flankieren, amplifiziert. Danach werden die PCR-Produkte von den Proben des Tatorts, des Opfers und des Verdächtigen zusammen mit einer Kontrolle als vier separate Spots auf einen Nylonfilter aufgetragen. Dieser wird dann mit vier verschiedenen Sonden behandelt, sodass jede Sonde mit jedem der verschiedenen PCR-Produkte in Kontakt kommt. Die Sonden binden spezifisch an jene Spots, deren Sequenzen mit denen der Sonde übereinstimmen. In diesem Beispiel sind die Muster der Probe vom Tatort und des Verdächtigen identisch. Damit ist bewiesen, dass die DNA am Tatort von dem Verdächtigen stammt.

ten Positionen auf den Chromosomen, daher kann man die einzelnen Banden allesamt identifizieren und in Computerdatenbanken eingeben. Multiplex-STR-Analysen bilden die Grundlage für die 1995 in Großbritannien eingerichtete nationale Datenbank. Ähnliche Datenbanken gibt es auch in anderen europäischen Ländern, seit 1998 auch in Deutschland und in den Vereinigten Staaten.

Heute werden die DNA-Fragmente für ein DNA-Fingerprinting mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt. Im gleichen Reaktionsansatz können mehrere standardisierte PCRs gleichzeitig ablaufen.



24.8 Multiplex-STR-Fingerprinting

Zunächst werden mithilfe von PCR-Primern drei verschiedene STR-Loci amplifiziert. Die zusammengehörigen Primer werden jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um die verschiedenen Loci auseinanderhalten zu können. Anschließend führt man mit den PCR-Produkten eine Agarosegelelektrophorese durch, um die Länge des Fragments und damit die Zahl der repeats zu ermitteln. Die Person im abgebildeten Beispiel ist für jeden Locus heterozygot, denn für jedes Primer-Set gibt es zwei verschieden große Banden.

Exkurs 24.1

Heldenhafter Kakadu liefert DNA-Beweis

Ein außergewöhnliches Beispiel für einen DNA-Beweis wurde einem Geschworenengericht in Dallas (Texas, USA) im September 2002 vorgelegt. Ein als Haustier gehaltener Kakadu hatte versucht, seinen Besitzer mit Schnabel und Krallen gegen Einbrecher zu verteidigen. Am Tatort gefundene Blutspuren stammten offenbar von einer Wunde, die der Vogel einem der Angeklagten am Kopf beigebracht hatte. Der besagte Vogel, ein Weißhauhenkakadu, kann mit seinem kräftigen Schnabel mühelos

dünne Äste von Bäumen durchbeißen. Bedauerlicherweise ermordeten die Einbrecher sowohl den Vogel als auch seinen Besitzer. Bei beiden wurde eine Autopsie durchgeführt, wobei man bei dem Vogel speziell auf Blutspuren am Schnabel und den Krallen achtete, um einen zusätzlichen DNA-Beweis zu haben. Mit dem eindeutigen DNA-Beweis konfrontiert, gab einer der Angeklagten die Tat zu – beschuldigte aber seinen Komplizen, den Mord begangen zu haben.

DNA-Tests und Wahrscheinlichkeit

Wenn sich zwei DNA-Proben unterscheiden, müssen sie von verschiedenen Personen stammen. Damit lassen sich mithilfe von DNA-Tests einzelne Personen problemlos aus dem Kreis der Verdächtigen ausschließen. Wenn aber nun der Fall eintritt, dass zwei DNA-Proben bei allen durchgeführten Tests übereinstimmen? Für eine positive Identifizierung muss zusätzlich die Wahrscheinlichkeit berücksichtigt werden. Dabei geht man von der Annahme aus, dass es höchst unwahrscheinlich ist, dass die DNA des Verdächtigen und die DNA vom Tatort nur rein zufällig übereinstimmen. Mittels DNA-Fingerprinting kann man heute Wahrscheinlichkeiten von weniger als 1 zur gesamten Weltbevölkerung erzielen, dass es sich um eine zufällige Übereinstimmung handelt. Vorsichtig sollte man jedoch sein, wenn nahe Verwandte in einem Gerichtsfall verdächtigt werden, denn die Wahrscheinlichkeit für eine Übereinstimmung ist bei Verwandten sehr viel größer als in der Allgemeinbevölkerung.

Die folgenden allgemeinen Schritte sind bei der Ermittlung der Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung wichtig:

1. Man sollte aus der Bevölkerungsgruppe, welcher der Verdächtige angehört, nach dem Zufallsprinzip Proben mehrerer Personen nehmen.
2. Man sollte den Genotyp dieser zufällig ausgewählten Personen bestimmen und die Häufigkeit der Allele an den Loci abschätzen, die für die DNA-Typisierung verwendet wurden.
3. Man sollte die Wahrscheinlichkeit berechnen, den Genotyp des Verdächtigen zu finden. Dazu geht man von der Annahme aus, dass die Allele dieser Person an jedem einzelnen Locus eine zufällige Auswahl aus der gesamten Population sind. (Außerdem wird vorausgesetzt, dass die überprüften Allele nicht gekoppelt, sondern unabhängig voneinander sind.)
4. Man sollte die für die verschiedenen Loci ermittelten Häufigkeiten multiplizieren. Die daraus resultierende Zahl repräsentiert die Gesamtwahrscheinlichkeit, dass die DNA des Verdächtigen per Zufall mit der Probe vom Tatort übereinstimmt.

Die populationsgenetischen Details, anhand derer man Wahrscheinlichkeiten bei genetischen Analysen von DNA oder Blutgruppen berechnet, würden den Umfang dieses Buches sprengen. Die bei DNA-Tests

erzielten Wahrscheinlichkeiten reichen heute für eine praktisch sichere Identifizierung jedoch absolut aus – vorausgesetzt, die Tests werden mit entsprechend guten DNA-Proben ordnungsgemäß durchgeführt.

Interessanterweise wurden schon Personen anhand von DNA-Beweisen für schuldig erklärt, bei denen die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung 1:100 betrug; allerdings lagen in diesen Fällen zusätzliche stützende Beweise vor. In Fällen, bei denen die Beweise in erster Linie auf den DNA-Tests beruhen, erwarten die Gerichte immer häufiger astronomische Wahrscheinlichkeiten von 1:1 Million oder 1:1 Milliarde.

Heutige DNA-Analysen mithilfe von mehreren STR-Sequenzen ermöglichen mit fast völliger Sicherheit eine eindeutige Identifizierung.

Die Zulassung von DNA-Beweisen

In den Vereinigten Staaten ist die Zulassung wissenschaftlicher Beweise in Strafverfahren gesetzlich durch den sogenannten Frye-Test (*Frye v. United States*, 1923) geregelt. Dieser besagt, dass neue wissenschaftliche Tests in entsprechenden Wissenschaftlerkreisen erst allgemein akzeptiert sein müssen, bevor sie vor Gericht als Beweismittel zugelassen werden. Zusätzlich werden in einigen Staaten noch Experten zurate gezogen, die dem Gericht bei der Interpretation wissenschaftlicher Beweise hilfreich zur Seite stehen sollen. In jüngster Zeit wurden DNA-Tests in fast allen Fällen als Beweismittel zugelassen, wenngleich es gelegentlich Ausnahmen gab. In Deutschland werden im polizeilichen Bereich üblicherweise staatliche Laboratorien damit beauftragt, DNA-Tests durchzuführen. Das Ergebnis eines DNA-Tests, eines Fingerabdrucks oder einer sonstigen Spur alleine kann nicht über Schuld oder Nichtschuld eines Verdächtigen entscheiden. Es wird nur als Indiz gewertet, das durch weitere ergänzt werden muss.

Die DNA-Technologie ermöglicht es, Personen nun mit weitaus größerer Sicherheit mit einem bestimmten Verbrechen in Zusammenhang zu bringen oder davon freizusprechen, als es mit den herkömmlichen Bluttests möglich war. Wie die Erfahrung gezeigt hat, kommt es bei Vorhandensein eines

DNA-Tests eher zu einer Verurteilung als ohne. Bei Vergewaltigungen werden routinemäßig DNA-Tests durchgeführt. In den meisten Vergewaltigungsfällen gibt der Angeklagte jedoch zu, das vermeintliche Opfer zu kennen, sodass die Identität kein Problem darstellt. Mit DNA-Tests kann man im Gesetzesvollzug auch die Zahl der möglichen Verdächtigen eingrenzen, vorausgesetzt, Geschlecht und Rassenmerkmale lassen sich durch diese ermitteln.

Das britische Justizwesen war im Bezug auf DNA-Tests wegbereitend. In einem der ersten Fälle konnte mittels eines DNA-Tests eine Person ausgeschlossen werden, die zunächst in Verdacht stand, den Sexualmord an einem jungen Mädchen begangen zu haben. Um den wahren Täter zu finden, unterzog die Polizei mehr als 5000 Männer des Dorfes Bluttests (AB0-Blutgruppen und Phosphoglucomutase), fand dabei aber keine Übereinstimmung. Überführt wurde der Mörder ironischerweise, weil ans Licht kam, dass er einen anderen Mann dafür bezahlt hatte, dass dieser sein Blut für ihn zum Test abgab. Ein nachfolgender DNA-Test bestätigte, dass seine DNA mit hoher Wahrscheinlichkeit mit derjenigen der Spermaprobe übereinstimmte, die beim Opfer genommen wurde. Daraufhin wurde er schließlich verurteilt. Insgesamt gesehen gibt es Großbritannien eine breite Unterstützung, DNA-Profile der gesamten Bevölkerung zu speichern.

In den Vereinigten Staaten wird gegenwärtig vom FBI eine nationale DNA-Datenbank geführt und diese bei der Suche nach Verdächtigen häufig per Computer durchsucht. Zwar werden gelegentlich Bedenken bezüglich der Wahrung der Privatsphäre geäußert, aber all diejenigen, für die zu Freiheit auch die Freiheit zählt, eine Straße entlanggehen zu können, ohne überfallen zu werden, sehen diese Entwicklungen mit Wohlwollen. Können DNA-Informationen auch missbraucht werden? Darauf könnte man antworten, dass jede Information missbraucht

werden kann. In der Vergangenheit wurden Menschen wegen ihrer Rassenzugehörigkeit oder anderer genetischer Merkmale verfolgt. Andererseits sind kaum detaillierte DNA-Informationen erforderlich, um Menschen einer bestimmten Rasse zuzuordnen. In der Praxis bedeutet die sehr viel höhere Genauigkeit von DNA-Tests im Vergleich zu beispielsweise Blutgruppenanalysen, dass es in der Regel möglich ist, einzelne Individuen zu identifizieren. Aus diesem Grund sind Rassenvorurteile bei DNA-Tests weitgehend ausgeschlossen.

In den Industrienationen haben DNA-Tests mittlerweile weite Verbreitung erlangt; viele Länder richten nationale Datenbanken ein.

Genealogische Forschungen mittels mitochondrialer DNA und Y-Chromosomen

Mitochondriale DNA-Sequenzen haben sich als sehr nützlich erwiesen, um die Evolution des modernen Menschen auf molekularer Ebene zurückzuverfolgen. Auch in der Forensik können Analysen der mitochondrialen DNA (mtDNA) eingesetzt werden. Der größte Vorteil besteht darin, dass mtDNA in jeder Zelle in zahlreichen Kopien vorliegt und so für eine Analyse leichter in ausreichenden Mengen zu gewinnen ist. Die Sequenz der mtDNA variiert bei nicht-verwandten Individuen zwischen 1 % und 2 %.

Der größte Nachteil ist, dass die mtDNA nahe verwandter Individuen keine Variationen zeigt. Mitochondrien werden über die Mutter vererbt, daher besitzen alle Menschen, die von derselben mütter-

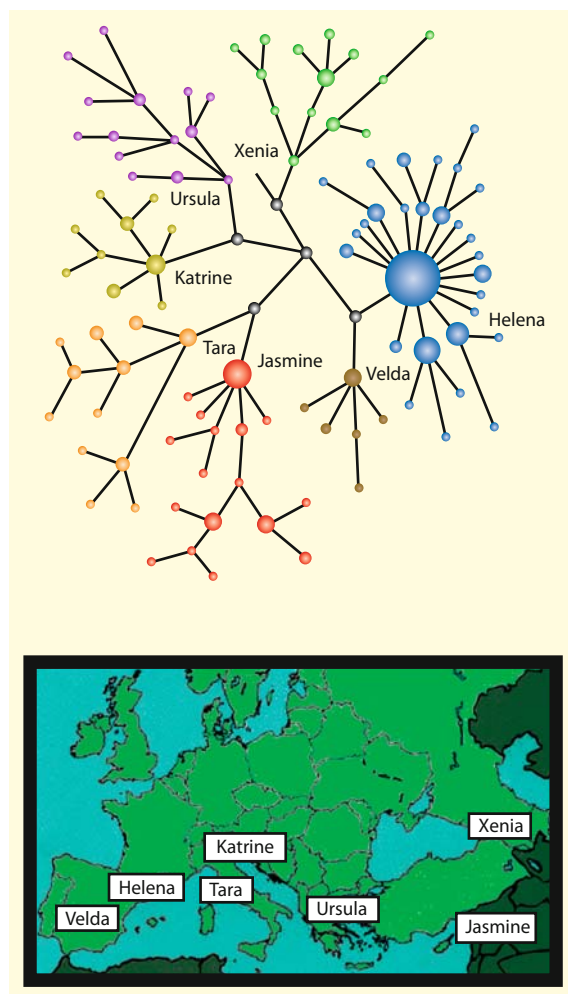
Exkurs 24.2

DNA-Tests vereiteln unsaubere Geschäfte

Mithilfe der DNA kann man nicht nur Menschen, sondern auch Tiere identifizieren. Was passiert, wenn ein unehrethafter Unternehmer minderwertigen Bonito unter erstklassigen Tunfisch mischt? Ein Geschmackstest würde deutlich machen, dass irgendetwas nicht stimmt, aber nicht ausreichen, um gesetzlich dagegen vorzugehen. Durch DNA-Analysen kann man die Identität der verwendeten Fischarten

selbst dann feststellen, wenn sie unter andere gemischt wurden. Anhand von Sequenzunterschieden und RFLP-Analysen von PCR-Fragmenten des Cytochrom-*b*-Gens, das auf der mitochondrialen DNA liegt, kann man zahlreiche nahe verwandte Fischarten auseinanderhalten. Die für die Kontrolle von Nahrungsmitteln zuständige Behörde der EU macht sich diese Methode inzwischen zunutze.

lichen Linie abstammen, die gleichen mtDNA-Sequenzen. Weisen zwei DNA-Proben unterschiedliche mtDNA-Sequenzen auf, so kann man folgern, dass sie von verschiedenen Menschen stammen. Im umgekehrten Fall gilt dies jedoch nicht. Identische mtDNA-Sequenzen finden sich bei allen Menschen, die mütterlicherseits miteinander verwandt sind.



24.9 Die sieben Töchter Evas

Oxford Ancestors belegte die sogenannten „sieben Töchter Evas“ mit folgenden Namen: Ursula (lateinisch: „kleine Bärin“), Xenia (griechisch: „die Gastfreundliche“), Helena (griechisch: „die Strahlende“), Velda (skandinavisch: „Herrscherin“), Tara (gälisch: „der Fels“), Katrina (griechisch: „die Reine“) und Jasmine (persisch: „die Blüte“). Durch einen Vergleich der mitochondrialen DNA-Sequenzen können Menschen europäischer Herkunft ihre Abstammungslinie auf eine dieser sieben Frauen zurückführen. Mit freundlicher Genehmigung von Oxford Ancestors (<http://www.oxfordancestors.com>).

Mithilfe mitochondrialer DNA hat man beispielsweise Familienstammbäume erstellt. Mittlerweile kann man an Firmen wie Oxford Ancestors sogar persönliche DNA-Proben zur Analyse schicken. Mit deren MatriLine-Service können alle Personen europäischer Abstammung ihre mütterliche Abstammungslinie bis auf eine von sieben weiblichen Ahnen zurückverfolgen (Abb. 24.9). Fast jeder Europäer oder jeder, dessen mütterliche Wurzeln in Europa liegen, stammt von einer von nur sieben Frauen ab; deren Abkömmlinge machen weit über 95 % der heutigen Europäer aus. Zu genealogischen Zwecken kann man jede dieser sieben Frauen als Gründerin („Urmutter“) einer mütterlichen Haplogruppe ansehen. Für Personen, deren mütterliche Wurzeln außerhalb Europas liegen, stehen ähnliche Analysen zur Verfügung, die aber noch nicht ganz so detailliert sind.

Im Gegensatz zur mtDNA wird das Y-Chromosom nur über die väterliche Seite vererbt. Das Y-Chromosom enthält zahlreiche STR-Sequenzen in nichtcodierenden Regionen. Von den meisten gibt es allerdings nur wenige verschiedene Allele, sodass sich nur einige wenige für forensische Analysen eignen. Ein Vorteil der Verwendung von Y-gebundenen STR-Loci ist, dass jede für das Y-Chromosom spezifische Sequenz von einem Mann stammen muss. Im Falle von Sexualverbrechen ist dies häufig hilfreich.

Stammbäume werden zunehmend durch DNA-Sequenzierung erstellt. Die mitochondriale DNA wird durch die Mutter vererbt und deswegen häufig dazu verwendet, die mütterliche Abstammungslinie zurückzuverfolgen. Anhand von Sequenzen des Y-Chromosoms kann man die Abstammung väterlicherseits zurückverfolgen.

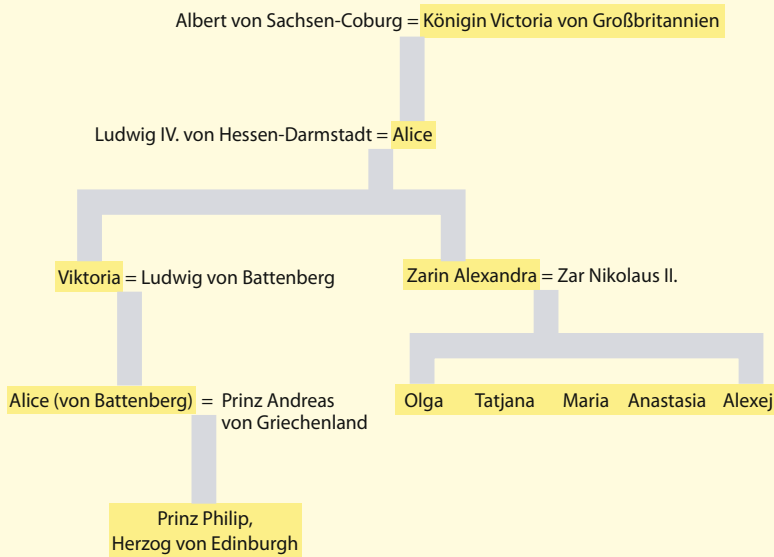
Identifizierung der sterblichen Überreste der russischen Zarenfamilie

Ein interessantes Beispiel aus der Forensik ist die Identifizierung der sterblichen Überreste der russischen Zarenfamilie. Dazu wurden sowohl STR-Sequenzen der chromosomalen DNA analysiert als auch die mitochondriale DNA sequenziert. Der letzte russische Zar, Nikolaus II. (Nikolaj Alexandrowitsch Romanow), wurde im Juli 1918 zusammen mit seiner Familie und einer Handvoll Diener

ermordet. Nach der Ermordung durch ein Exekutionskommando der Bolschewiki wurden die Leichen in einem versteckten Massengrab begraben. Im Jahr 1989 wurde dieses Grab entdeckt, zwei Jahre später grub man neun Skelette aus. Eingehende forensische Analysen der Knochen, Kleidung und persönlichen Besitztümer aus dem Grab lieferten den Beweis, dass es sich bei einigen der Skelette tatsächlich um den Zaren und seine Familie handelte. Im Auftrag der russischen Regierung führten amerikanische und britische Wissenschaftlerteams DNA-Tests durch.

An den neun Knochenproben nahmen sie Analysen der Kern-DNA und der mtDNA vor. Fünf der Leichname waren eindeutig miteinander verwandt, wie STR-Analysen an fünf verschiedenen Genorten zeigten (Abb. 24.10). Es handelte sich um Zar Nikolaus, seine Gemahlin, Zarin Alexandra, sowie drei ihrer vier Töchter. Die vierte Tochter und ihr Sohn, der Thronfolger Prinz Alexej, fehlten – ihre Leichen waren offenbar vor dem Massenbegräbnis völlig verbrannt. Bei den anderen vier Leichen handelte es sich um nicht mit der Zarenfamilie verwandte Bedienstete.

a mitochondriale Abstammung



b STR-Analyse

	Zarin Alexandra = Zar Nikolaus II.				
STR-1	15,16		15,16		
STR-2	8,8		7,10		
STR-3	3,5		7,7		
STR-4	12,13		12,12		
STR-5	32,36		11,32		
	Olga Tatjana Maria Anastasia Alexej				
STR-1	15,16	15,16	15,16		
STR-2	8,10	7,8	8,10		
STR-3	5,7	5,7	3,7		
STR-4	12,13	12,13	12,13		
STR-5	11,32	11,36	32,36		

nicht gefunden

nicht gefunden

24.10 Die russische Zarenfamilie

a Familienstammbaum von Zarin Alexandra, Zar Nikolaus II. und ihren Kindern. Gelb hervorgehoben sind Personen mit identischer mtDNA. **b** STR-Analyse der Gebeine von Zar Nikolaus II. und seiner Familie. Die Knochen wurden mithilfe von PCR-Primern für fünf verschiedene STRs (mit 1–5 bezeichnet) untersucht. Die drei Kinder besaßen jeweils Kombinationen der bei den Eltern gefundenen STR-Fragmente. Die Zahl des STRs ist jeweils mit einem Farbcode versehen: Rot bei Herkunft von Zar Nikolaus II. und Blau bei Herkunft von Zarin Alexandra. Von zweien der Kinder wurden erst 2007 Knochenfragmente gefunden und als solche im Jahr 2008 identifiziert (hier noch als „nicht gefunden“ bezeichnet).

Die Identität der sterblichen Überreste der Zarin wurde durch Sequenzierung der mitochondrialen DNA bestätigt. Zarin Alexandra war die Enkelin von Königin Victoria von Großbritannien. Alexandras Schwester, Prinzessin Viktoria von Hessen-Darmstadt, war die Großmutter von Prinz Philip, dem Herzog von Edinburgh und Gatten der derzeitigen britischen Königin. Eine Blutprobe von Prinz Philip ergab eine identische mtDNA-Sequenz zu derjenigen von den wahrscheinlichen sterblichen Überresten von Zarin Alexandra.

Die mtDNA des Zaren selbst ergab ein noch verblüffenderes Resultat. Zwei entfernte Verwandte des Zaren mütterlicherseits lieferten DNA-Proben für einen Vergleich: Gräfin Xenia Sfiris und der Herzog von Fife. Ihre mtDNA-Sequenzen waren untereinander identisch. Die mtDNA des Zaren war bis auf Position 16169 ebenfalls identisch mit der seiner Verwandten. An dieser Position hatten die beiden Verwandten jeweils ein T, der Zar ein Gemisch aus 70 % T und 30 % C. Das legt nahe, dass die Probe entweder verunreinigt war oder dass er von dem selten auftretenden Phänomen der sogenannten **Heteroplasmie** betroffen war.

Einige wenige Menschen besitzen zwei Populationen von Mitochondrien mit geringfügig abweichender mtDNA-Sequenz – das nennt man Heteroplasmie. Gelegentlich wird dieser Zustand über die mütterliche Linie vererbt. Häufig ist die kleinere Mitochondrienpopulation bei Nachkommen überhaupt nicht mehr vorhanden. Endgültig geklärt wurde die Angelegenheit durch Exhumierung des Leichnams von Georgi Romanow, dem Bruder des Zaren, der 1899 an Tuberkulose starb. Georgi zeigte ebenfalls die Heteroplasmie – mit dem gleichen Verhältnis von T und C an Position 16169 seiner mtDNA. Da Heteroplasmie so selten auftritt, kann man bei einer Übereinstimmung mit extrem hoher Wahrscheinlichkeit von einer korrekten Identifizierung ausgehen. In diesem Fall wurde das Wahrscheinlichkeitsverhältnis für die Echtheit des Beweises auf über 100 Millionen geschätzt!

Am 17. Juli 1998 wohnten mehr als eine Million Menschen der Wiederbestattung des letzten Monarchen von Russland, Zar Nikolaus II., seiner Gemahlin, Zarin Alexandra, und drei seiner fünf Kinder, Olga, Tatjana und Maria, bei. Die Beerdigungszeremonie fand in der Peter-und-Paul-Festung in St. Petersburg (das in der Zeit des Kommunismus Leningrad hieß) statt.

Durch Analysen der Kern-DNA und der mitochondrialen DNA konnten die sterblichen Überreste der russischen Zarenfamilie eindeutig identifiziert werden.

► Weiterführende Literatur

- Butler JM (2006) Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci* 51: 253–265
- Chaix R, Austerlitz F, Khégay T, Jacquesson S, Hammer MF, Heyer E, Quintana-Murci L (2004) The genetic or mythical ancestry of descent groups: Lessons from the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 75: 1113–1116
- Gusmão L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Roewer L, Tyler-Smith C, Schneider PM (2006) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci Int* 157: 187–197
- Horsman KM, Bienvenue JM, Blasier KR, Landers JP (2007) Forensic DNA analysis on microfluidic devices: A review. *J Forensic Sci* 52: 784–799
- Jobling MA, Gill P (2004) Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet* 5: 739–751
- Katoh T, Munkhbat B, Tounai K, Mano S, Ando H, Oyungereel G, Chae GT, Han H, Jia GJ, Tokunaga K, Munkhtuvshin N, Tamiya G, Inoko H (2005) Genetic features of Mongolian ethnic groups revealed by Y-chromosomal analysis. *Gene* 346: 63–70
- Redd AJ, Chamberlain VF, Kearney VF, Stover D, Karafet T, Calderon K, Walsh B, Hammer MF (2006) Genetic structure among 38 populations from the United States based on 11 U.S. core Y chromosome STRs. *J Forensic Sci* 51: 580–585
- Sahoo S, Singh A, Himabindu G, Banerjee J, Sitalaximi T, Gaikwad S, Trivedi R, Endicott P, Kivisild T, Metspalu M, VILLEMS R, Kashyap VK (2006) A prehistory of Indian Y chromosomes: Evaluating demic diffusion scenarios. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 843–848
- Schneider PM (2007) Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Sci Int* 165: 238–243
- Sobrinho B, Brión M, Carracedo A (2005) SNPs in forensic genetics: A review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* 154: 181–194
- Varsha A (2006) DNA fingerprinting in the criminal justice system: An overview. *DNA Cell Biol* 25: 181–188
- Woolfe M, Primrose S (2004) Food forensics: Using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol* 22: 222–226

Bioethik in der Biotechnologie

Annäherung an die Bioethik

Macht, Profit, Armut und Zugang

Unwissenheit, Neuerungen und kulturelle Gesichtspunkte

Mögliche Gefahren für den Einzelnen, die Gesellschaft oder die Natur

Gesundheitsfürsorge und verwandte Themen

- Bioterrorismus und bakteriologische Kriegsführung

- Gentherapie

- Ersetzen von Organen, künstliche Körperteile und der bionische Mensch

- Antibiotika und Wirkstoffe gegen Viren

Eingriffe in die Natur

- Transgene Nutzpflanzen

- Verlust der biologischen Vielfalt

- Tierversuche

- Transgene Tiere und Klonen von Tieren

- Transgene Tiere für Kunst und Vergnügen

Veränderung der menschlichen Keimbahn

- Genetische Untersuchungen in der Schwangerschaft und Schwangerschaftsabbruch

- Stammzellenforschung

- Klonen von Menschen

- Eugenik und selektive Züchtung

- Transgene Menschen und Designerbabys

Wissen, Identität und Ideologie

- Privatsphäre und persönliche genetische Informationen

- Vorgewarntsein oder Unkenntnis

- Forensik und Verbrechen

- Konflikt von Wissenschaft und Religion

- Konflikt mit egalitären Ideologien

- Besitz genetischer Informationen

Biologische Probleme auf lange Sicht

Weiterführende Literatur

Annäherung an die Bioethik

In diesem Buch geht es um eine Einführung in die Wissenschaft der Molekularbiologie und deren Anwendungen in der Biotechnologie. Im letzten Kapitel soll nun nicht die Bioethik an sich erklärt werden; es ist vielmehr ein Versuch, kurz und bündig die ethischen Fragen zusammenzufassen, die sich aufgrund der Fortschritte in der Biotechnologie ergeben. In jedem Kapitel des Buches wurde auf Probleme und Möglichkeiten hingewiesen. Es wurden eine Menge Fragen gestellt, aber nur wenige definitive Antworten gegeben, weil moralische Entscheidungen unserer Ansicht nach der Leser treffen sollte, nicht die Autoren. Andererseits haben wir auch nicht versucht, unsere eigenen Meinungen, die in vielen Fällen ziemlich offenkundig sind, künstlich zu verbergen. Viele ethische Fragen wurden bereits entschieden, ob durch die allgemeine Akzeptanz der Öffentlichkeit oder durch eine entsprechende Gesetzgebung. Allerdings können Gesetze auch wieder aufgehoben werden, und was als moralisch akzeptabel gilt, unterliegt einem ständigen Wandel.

Vieles von dem, was als „offizielle“ Bioethik angesehen wird, stammt aus dem klinischen Bereich und bezieht sich auf die Praktiken der Medizin sowie auf klinische Tests und Versuche. Diese Prinzipien gelten zwar für das Testen und die Anwendung klinischer Protokolle, die den Einsatz von gentechnisch verändertem Material umfassen, viele der neueren Streitfragen in der Genetik und Biotechnologie decken sie jedoch nicht ab. Statt der traditionellen, klinisch orientierten Ethik wollen wir uns hier Fragen zuwenden, die sich aufgrund der wissenschaftlichen Fortschritte in jüngerer Zeit ergaben. Die Themenliste wurde teilweise anhand einer Umfrage unter Studenten erstellt. Bevor wir uns den einzelnen wissenschaftlichen Themen zuwenden, werden noch einige allgemeine Fragen erörtert.

Die typische Bioethik erwächst größtenteils aus der Medizin. Hier werden jedoch neue Fragen betrachtet, die sich aus der modernen Gentechnologie ergeben.

Macht, Profit, Armut und Zugang

Moral ist ein persönlicher und kostspieliger Luxus

Henry B. Adams, 1838–1918

Viele der von der modernen Biologie und Gentechnik aufgeworfenen Fragen stellen sich für andere Gebiete genauso. Wer soll die Technologie kontrollieren? Was sollte verboten und was erlaubt werden, und wer soll das entscheiden? Wer sollte davon profitieren? Sollten die neuen und kostspieligen Technologien auch denjenigen zugänglich sein, die sich diese gar nicht leisten können? Wenn ja, wer sollte dies bezahlen, die Regierung oder Privatpersonen? Damit verwandt ist die Frage bezüglich des Zugangs zu Technologien für die Bewohner armer Länder der Dritten Welt. Auf diese Frage erhält man ganz unterschiedliche Antworten, je nach persönlicher Meinung und kultureller Anschauung. In jedem Fall sind die Fragen weder neu, noch auf die Biologie beschränkt, geschweige denn auf die Biotechnologie, und wir wollen auch gar nicht den Versuch unternehmen, sie hier zu beantworten.

In den letzten fünf Jahrzehnten ist die Kluft zwischen Arm und Reich immer größer geworden. Dies gilt ebenso für die Kluft zwischen Industrienationen und der Dritten Welt, wie auch, vor allem in jüngster Zeit, innerhalb der Industrienationen selbst. Zum Teil ist dies durch den technologischen Fortschritt begründet. Durch die Mechanisierung sind unausgebildete menschliche Arbeitskräfte nicht mehr so gefragt. So werden beispielsweise in den Industrieländern noch nicht einmal 5 % der Bevölkerung dazu benötigt, Nahrungsmittel für alle anzubauen (im Vergleich zu ungefähr 90 % im Mittelalter). Auch die Zahl der Menschen, die für die Produktion von Industriegütern benötigt wird, hat sich durch die Automatisierung verringert. Infolgedessen hat ein erheblicher Anteil der Bevölkerung zunehmend Schwierigkeiten, eine lohnenswerte Arbeit zu finden. Ob die Biotechnologie den bereits vorherrschenden Trend zur Automatisierung noch verstärken wird oder ob sie dazu beitragen kann, Armut zu mildern, ist noch unklar.

Viele klinische Methoden, die neue Technologien erfordern, sind kostspielig und für die Armen außer Reichweite. Das ist das alte Problem der Verteilung des Reichtums in technologischer Gestalt und steht nicht speziell mit der Gentechnik in Zusammenhang. Die Reichen haben stets einen besseren Zugang zu teurer Gesundheitsfürsorge, seien dies Medikamente,

chirurgische Eingriffe oder einfach nur eine qualitativ hochwertige Krankenpflege. Beispielsweise werden heute älteren Menschen oder Personen mit runzliger Haut Botox-Behandlungen (mit dem Botulinustoxin) zur Beseitigung von Falten angeboten (Abb. 25.1) – vorausgesetzt, diese Menschen können sich das leisten. Botox-Spritzen kosten zwischen 300 und 600 Euro (das entspricht in vielen Ländern der Dritten Welt weit mehr als einem Monatslohn). Die Wirkung hält aber nur etwa fünf Monate an. Botulinustoxin vom Typ A ist ein toxisches Protein, das von dem Bakterium *Clostridium botulinum* produziert wird und Nahrungsmittel vergiftet. Das Toxin blockiert die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin an den Nervenzellen, welche die Muskelkontraktion steuern. Daher kann es in sehr geringen Mengen angewendet die Muskelkontraktionen hemmen, die für die Bildung von Falten und Runzeln verantwortlich sind (für nähere Einzelheiten s. Kap. 23).

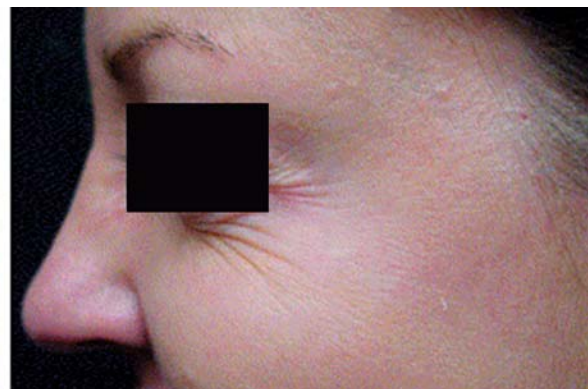
Bei der Erörterung der sozialen Aspekte der Gentherapie und anderer neuer Technologien taucht häufig die Frage auf, wie diese Ländern der Dritten Welt zugänglich gemacht werden sollen. Angesichts von Millionen Todesopfern pro Jahr durch Malaria, Tuberkulose und Aids wird der Nutzen kostspieliger, fortschrittlicher Technologien kaum infrage gestellt. Allerdings können sich die meisten Bewohner von Ländern der Dritten Welt noch nicht einmal die einfachsten Malariamittel leisten, geschweige denn Medikamentencocktails gegen Aids. Die meisten haben nicht einmal sauberes Trinkwasser. Von einigen wissenschaftlichen Fortschritten werden mit Sicherheit auch die armen Nationen profitieren. Ein Beispiel hierfür ist die

Massenimmunisierung gegen Infektionskrankheiten mit kostengünstigeren, wirkungsvolleren Impfstoffen. Transgene Feldfrüchte, die auch auf nährstoffarmen Böden wachsen und ohne Düngemittelsatz einen höheren Ertrag liefern, könnten ebenfalls hilfreich sein. Gewaltige Fortschritte in der traditionellen Pflanzenzüchtung führten zwischen den 1940er- und den 1980er-Jahren (während der sogenannten „Grünen Revolution“) zu drastischen Ertragssteigerungen. Wenn jedoch Menschen vor dem Hungertod gerettet werden, steigt die Bevölkerungszahl. Dadurch kommt es wiederum zu Überbevölkerung, was die Ausbreitung von Infektionskrankheiten begünstigt. Solange die Welt die Bevölkerungsexplosion nicht unter Kontrolle bekommt, geraten wir lediglich in eine sinnlose Spirale, in der ein Problem das nächste ablöst.

Manchmal profitieren auch die Armen vom technologischen Fortschritt. In anderen Fällen vergrößert dieser die Kluft zwischen Arm und Reich.

Unwissenheit, Neuerungen und kulturelle Gesichtspunkte

Einen weiteres generelles Problem sind die Auswirkungen von Unwissenheit und Neuerungen auf die vermeintliche Moral. Der Mensch hat allgemein Angst vor Unbekanntem, und diese Angst wird



25.1 Botox-Behandlung: vorher und nachher

Behandlung von „Krähenfüßen“ im Bereich um die Augen mit jeweils 12 U Botox. Das Toxin wurde an drei Stellen gespritzt. Die Bilder zeigen die Patientin vor und zwei Wochen nach der Behandlung. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung aus: Flynn TC (2006) Update on botulinum toxin. *Semin Cutan Med Surg* 25: 115.

häufig in moralistischer Hinsicht ausgedrückt. Fortschritte in der Wissenschaft und technische Innovationen werden meist mit den Argumenten begrüßt, sie seien entweder unmoralisch oder gefährlich für die Gesellschaft oder gar beides. So verglichen beispielsweise übertrieben enthusiastische Priester bei der Erfindung der Dampflokomotive die Flammen in der Feuerbüchse mit dem Höllenfeuer. Dieser Aspekt der Moral hat nicht speziell etwas mit Wissenschaft zu tun, er zeigt sich auch auf anderen Gebieten. So werden zum Beispiel neue Moden in der Kleidung, Musik oder Unterhaltung häufig als Beweis für den moralischen Verfall verurteilt.

Wissenschaftlicher Fortschritt sieht sich mit einer Angst vor Neuem konfrontiert, vermischt mit einer Angst, die aus Unwissenheit erwächst. Gentechnik und das Klonen von Menschen sind sehr komplexe Themen. Nur wenige Personen aus der Bevölkerung können die wissenschaftlichen Fakten dahinter beurteilen. Weil über diese Themen nur so wenige Menschen Bescheid wissen, werden – bewusste und unabsichtliche – Fehlinformationen zum wirklichen Problem in der Debatte. Die Unterhaltungsindustrie stellt gentechnisch veränderte oder geklonte Organismen häufig als bössartig und gruselig dar.

Die andere Seite dieses Phänomens ist: Sobald eine neue Mode oder Technik erst einmal vertraut ist, verfliegen die Einwände gegen ihre angebliche Unmoral. Als die Rockmusik aufkam, wurde sie von Priestern weithin als unmoralisch verurteilt. Heute wird in vielen Kirchen im Gottesdienst Rockmusik gespielt, um die Verbindung zur Jugend nicht abreißen zu lassen. Zahlreiche Rockbands tragen mit ihren Texten dazu bei, das Wort Gottes zu verbreiten. Lebensrettende Pockenimpfungen wurden einst damit gleichgesetzt, „Gott zu spielen“, sind aber heute gesellschaftlich weitgehend akzeptiert.

Als mit dem Schaf Dolly das erste Tier geklont wurde, kam dies überall in die Schlagzeilen und löste eine erhitzte Ethikdebatte aus. Heute herrscht großer Aufruhr bezüglich des Klonens von Menschen und der Verwendung von Stammzellen. Das Klonen von Tieren ist indessen weithin akzeptiert, und die erfolgreiche Klonierung einer neuen Art ist kaum noch eine Meldung auf der Titelseite wert. Als die ersten durch *in vitro*-Fertilisation gezeugten „Retortenbabys“ zur Welt kamen, machten selbsternannte Vorreiter der menschlichen Moral sie zum Gegenstand erbitterter ethischer Debatten. Am 25. Juli 1978 wurde in England Louise Brown geboren, das erste im Reagenzglas gezeugte Baby der Welt. Seither kamen Millionen weitere hinzu, und mittlerweile wird die künstli-

che Befruchtung sogar von den meisten Krankenversicherungen bezahlt. Im Dezember 2006 brachte Louise Brown selbst ihren auf natürlichem Weg gezeugten Sohn Cameron John zur Welt, was zeigt, dass sich Retortenbabys als Erwachsene auf ganz normale Weise fortpflanzen können. Die „moralischen Aspekte“ dieses Themas werden heute kaum noch diskutiert. Inzwischen kann man Retortenbabys sogar schon als Schmuckanhänger kaufen (Abb. 25.2). Die Tatsache, dass die meisten „grundlegenden ethischen Fragen“ fast genauso schnell wieder verschwinden wie die Modetrends bei Frauenkleidern, stellt ihre tiefe Bedeutung ziemlich in Frage.

Es gibt noch einen weiteren Faktor, der die meisten ethischen Entscheidungen ausgesprochen subjektiv macht: kulturelle Gesichtspunkte. Auffälligerweise lehnen Amerikaner die Gentechnik zumeist aus religiösen Gründen ab. Europäer stellen eher die potenziellen Gefahren für die menschliche Gesund-



25.2 Retortenbaby als Schmuckstück

Luftdicht versiegelt in seinem Reagenzglas ruht das „Retortenbaby“ von Onch friedlich in seinem Nährmedium! Mit freundlicher Genehmigung von Onch Movement, www.onchmovement.com.

heit oder die Umwelt zur Debatte. Der Aufruhr um die Gefahren genetisch modifizierter Nutzpflanzen und Nahrungsmittel entstand daher zuerst in Westeuropa. Die ethischen Bedenken bezüglich der Verwendung menschlicher Stammzellen hingegen wurden in Amerika mit der religiös motivierten Abtreibungsdiskussion vermischt. Man denke nur daran, dass Schwangerschaftsabbrüche in den meisten westeuropäischen Ländern bereits in den 1950er-Jahren gesetzlich erlaubt wurden, in Amerika jedoch erst in den 1970er-Jahren. War es moralisch vertretbar, 1960 in England eine Abtreibung vorzunehmen, im gleichen Jahr in den Vereinigten Staaten aber unmoralisch? Lässt dies darauf schließen, dass Moral überwiegend örtliche Sitten und Gebräuche ausdrückt? Wenn ja, wessen ethische Normen sollten dann gelten? Andersherum könnte man auch argumentieren, eine Abtreibung sei unmoralisch (oder auch nicht), und die lokal unterschiedliche Gesetzgebung spiegle diese Ethik einfach nicht wider.

Ethische Ansichten können sich mit der Zeit ändern und je nach Kultur unterschiedlich sein. Unwissen und Gewohnheiten haben in der Regel Einfluss auf neue Entdeckungen, wobei dieser Einfluss aber im Laufe der Zeit nachlässt.

Mögliche Gefahren für den Einzelnen, die Gesellschaft oder die Natur

Wie steht es mit wirklichen Gefahren im Gegensatz zu vagen Ängsten vor dem Unbekannten? Wie die Geschichte gezeigt hat, können die meisten Technologien zu verschiedensten Zwecken eingesetzt werden und sich entsprechend segensreich oder zerstörerisch auswirken. Beispielsweise wird Dynamit im Bergbau und in Steinbrüchen, aber auch als Munition verwendet. Eine verbesserte Ernährung sorgt für gesündere Kinder, allerdings auch für widerstandsfähigere Soldaten, die andere töten. Mit einem Teppichmesser kann man einen Karton mit Hilfsgütern des Roten Kreuzes öffnen oder auch ein Flugzeug entführen. Und so weiter. Wie jede andere Technologie kann die Biotechnologie natürlich ebenfalls missbraucht werden. Sollten wir also keine Fortschritte mehr machen, weil damit Missbrauch getrieben werden könnte?

Und was ist mit den unbeabsichtigten oder zufälligen Gefahren der Biotechnologie? Sämtliche Verbesserungen der Gesundheit und des Wohlergehens des Menschen haben auch unvorhersehbare Nebenwirkungen. Bei einer höheren Lebenserwartung gibt es mehr einsame alte Menschen, was wiederum das Gesundheitswesen belastet. Ein größerer Anteil an Rentnern bringt die Verteilung des Reichtums durcheinander. Eine geringere Kindersterblichkeit verschärft die Überbevölkerung und wirkt sich durch den Verbrauch knapper Ressourcen und durch die Belastung mit Schadstoffen auf die Umwelt aus. Überbevölkerung begünstigt zudem die Entstehung und Ausbreitung neuer Infektionskrankheiten. Andere Technologien bringen ebenfalls unerwünschte Folgeerscheinungen mit sich. Durch das moderne Transportwesen können Kranke viel schneller in Krankenhäuser gebracht werden, andererseits sterben viele Menschen durch Autounfälle. Sollten wir Autos, Züge und Flugzeuge abschaffen, weil bisweilen Menschen dadurch zu Tode kommen?

Weit verbreitet ist die Angst, die Gentechnik könne Monster, mutierte Menschen oder virulente neue Krankheiten hervorbringen. Wird irgendein Genkonstrukt aus dem Labor entkommen, sich mit einem Organismus in der Natur kreuzen und ein furchterregendes Hybridmonster hervorbringen (Abb. 25.3)? Wie viele Experimente sind erforderlich, um herauszufinden, ob so etwas tatsächlich geschehen könnte? Wie kann man alle möglichen Resultate oder Folgeerscheinungen vorhersehen? Sollten diese Technologien verboten werden, bis wir alle Möglichkeiten vorhersagen können? In Wirklichkeit vertreten nur sehr wenige Menschen den ganz extremen Standpunkt, sämtliche technologischen Fortschritte zu verbieten. Die meisten Menschen würden eher von Fall zu Fall individuell entscheiden.

Im Jahr 1975, in der Anfangszeit der rekombinanten DNA-Forschung, traf sich die Gemeinschaft der Molekularbiologen in Asilomar, Kalifornien, und rief dazu auf, jene Versuche vorübergehend einzustellen, die als potenziell gefährlich galten. Diese Pause ermöglichte dem NIH, allgemeine Richtlinien für die Forschungen mit rekombinanter DNA zu erstellen.

Banaler, aber gleichzeitig auch realistischer ist die Besorgnis, gentechnisch optimierte Merkmale von Nutzpflanzen könnten auf genetischem Weg auf Unkräuter übertragen werden. Die verbesserten Unkräuter würden dadurch ähnliche Vorteile wie Resistenz gegen Trockenheit, Insekten oder Herbizide erlangen. Die Gefahr, dass gentechnisch veränderte Organismen oder Cluster modifizierter Gene sich

25.3 Die Chimäre der alten Griechen

Die Chimäre war ein monsterhaftes Mischwesen der griechischen Mythologie, eine Kombination aus Löwe, Ziege und Feuer speiendem Drachen, und lebte angeblich im Südwesten von Anatolien (in der heutigen Türkei). Diese moderne Darstellung schuf Rebecca Kemp, <http://www.wildlife-fantasy.com/>.



Copyright © Rebecca Kemp

verselbstständigen, und die sich daraus ergebenden Auswirkungen auf die Umwelt sind eine wesentliche Quelle für Dispute. Natürlich können Ökosysteme auch durch die Einführung einer neuen Art von anderswoher (ohne gentechnische Modifikation) geschädigt werden. Ein klassisches Beispiel ist das Auftauchen der Kaninchen in Australien.

Die potenziellen Gefahren der Gentechnik oder anderer neuer Technologien exakt vorherzusagen, ist äußerst schwierig.

Gesundheitsfürsorge und verwandte Themen

Eine Reihe ganz spezieller ethischer Streitfragen könnte man zwanglos unter der Überschrift Gesundheitsfürsorge zusammenfassen. Sie betreffen in erster Linie die gegenwärtige Generation und weniger die genetische Veränderung zukünftiger Generationen. Nur wenige dieser Fragen sind aus moralischer Sicht wirklich neu. Sobald eine Technologie nicht mehr ganz so neu ist und langsam akzeptiert wird, schwinden auch die damit einhergehenden moralischen Be-

denken. Neben der Neuartigkeit werfen die Themen Sicherheit und Kosten Probleme auf, die man in Angriff nehmen muss, wenn es um Gesundheitsfürsorge geht.

Bioterrorismus und bakteriologische Kriegsführung

Objektiv gesehen ist die Wahrscheinlichkeit, einen biologischen Angriff zu überleben, weitaus größer, als die Chance, einen Nuklearschlag zu überstehen (für Details zur bakteriologischen Kriegsführung s. Kap. 23). Dennoch empfinden Menschen, die mit Mikrobiologie nicht so vertraut sind, Biowaffen als sehr bedrohlich und betrachten sie häufig als unmoralischer als chemische oder Kernwaffen. Diese unverhältnismäßige Reaktion auf die bakteriologische Kriegsführung zeigte sich beispielsweise deutlich in der Reaktion auf die Milzbrandanschläge von 2001/2002 in den Vereinigten Staaten nach dem terroristischen Anschlag auf das World Trade Center. Durch die Milzbrandanschläge kamen zwar nur sehr wenige Menschen zu Tode, sie lösten aber eine große Angst aus und entwickelten sich zu einem heißen Thema in den Medien. Zu den wesentlichen Gründen für diese Angst zählt wahrscheinlich, dass die

Erreger nicht sichtbar sind. Gewehre und Bomben sind problemlos erkennbar, infektiöse Mikroorganismen hingegen können mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden. Die Angst vor unsichtbaren Gefahren kann ziemlich zwanghaft werden.

Ob man über bakteriologische Kriegsführung Forschungen betreiben sollte oder nicht, ist heftig umstritten. Erkenntnisse, wie man sich gegen eine Infektionskrankheit schützen kann, liefern zwangsläufig auch Informationen, die bei einem Einsatz der Erreger gegen einen Feind hilfreich wären. Diese Problematik betrifft auch andere Gebiete. So ist beispielsweise die Technologie zum Bau eines Kernkraftwerks eng verwandt mit der, die man zur Entwicklung von Kernwaffen benötigt. Das gleiche Know-how kann häufig für positive wie auch für negative Ziele genutzt werden.

Ein weiteres Problem betrifft den Gegensatz zwischen der Dritten Welt und den Industrienationen. Im Zusammenhang mit bakteriologischen Biowaffen wurde häufig von „Kernwaffen der Armen“ gesprochen. Nationen, die zu arm sind, um kostspielige High-Tech-Waffen zu entwickeln, könnten relativ problemlos und kostengünstig einfache biologische Waffen zusammenbasteln. Die bakteriologische Kriegsführung bildet somit für Länder der Dritten Welt eine potenzielle Möglichkeit, sich vor den reichen Nationen zu schützen. Verschlimmert wird dieser Aspekt noch durch die Tatsache, dass Soldaten aus wohlhabenden Ländern eine höhere Lebenserwartung und eine bessere Lebensqualität haben als die Bewohner der Dritten Welt. Somit könnte eine arme Diktatur in Versuchung geraten, eine biologische Waffe innerhalb ihrer eigenen Staatsgrenzen freizusetzen und Todesfälle unter dem eigenen Volk in Kauf zu nehmen, nur um reiche Eindringlinge dadurch abzuschrecken. Hierfür gibt es einen historischen Präzedenzfall. Im Ersten Weltkrieg waren an der Ostfront Typhusepidemien verbreitet. Die Serben verloren in den ersten sechs Kriegsmonaten 150 000 Männer durch Typhus, darunter mehr als die Hälfte ihrer 60 000 österreichischen Kriegsgefangenen. Paradoxerweise half dies den Serben letztlich, weil die Österreicher ihre Armeen aus Angst vor einer Infektion von Serbien fernhielten. Nationen der Dritten Welt sind aufgrund teilweise extremer Armut viel eher an Tod und Krankheit gewöhnt. Dies erklärt vielleicht unter anderem, warum die reichen Nationen so sehr darauf aus sind, bakteriologische Kriegsführung zu verbieten, während die viel kostspieligeren Massenvernichtungswaffen weiter im Umlauf bleiben.

Fragen:

Hat die Methode, mit der eine große Zahl von Menschen getötet wird, einen Einfluss auf die moralische Einstellung zu diesem Handeln?

Sind Forschungen zur Entwicklung bakteriologischer Biowaffen unmoralischer als Forschungen an Kernwaffen und chemischen Waffen oder nicht?

Sollte man präventive Forschung mit Argwohn betrachten, weil die gleichen oder verwandte Technologien sowohl zum Angriff als auch zur Verteidigung eingesetzt werden können?

Sollten biologische Waffen durch international geltende Gesetze verboten werden, während kostspieligere Massenvernichtungswaffen erlaubt bleiben? Ist es nicht zu akzeptieren, dass arme Länder Biowaffen besitzen, aber in Ordnung, dass „verantwortungsbewusste“ fortschrittliche Nationen sie haben?

Biowaffen erzeugen im Verhältnis zu ihrer Wirkung unverhältnismäßig starke emotionale Reaktionen. Dies liegt vermutlich daran, dass die infektiösen Erreger nicht mit bloßem Auge sichtbar sind.

Gentherapie

Die Technik der Gentherapie wurde in Kapitel 17 erläutert. Erbliche Veränderungen der menschlichen Keimbahn (d.h. transgene Menschen) sollen hier ausklammert werden, es geht lediglich um somatische Gentherapie. Die damit in Zusammenhang stehenden Probleme sind weitgehend die gleichen wie bei allen anderen neuen Technologien: Sicherheit und Kosten. Was die praktische Anwendung anbelangt, befindet sich die Gentherapie noch überwiegend im Versuchsstadium, und die meisten Fragen drehen sich um die Sicherheit der Methoden sowie um die Vermeidung möglicher Schäden für die Patienten. In den vergangenen Jahren sind in Einzelfällen Patienten nach einer versuchsweise verabreichten Gentherapie gestorben oder haben schwere Schäden erlitten. Andererseits leiden die meisten dieser Patienten an unheilbaren Krankheiten und haben ohnehin nur eine geringe Aussicht auf ein langes, gesundes Leben.

Fragen:

Wenn man weiß, dass man nur noch ein oder zwei Jahre zu leben hat, warum sollte man dann nicht eine neue Behandlung riskieren, an der man zwar vielleicht sterben wird, die einem aber auch noch viele Jahre in Gesundheit beschermen könnte?

Bremsen übermäßige Sicherheitsbestimmungen aufgrund von einem oder zwei unglücklich verlaufenen Fällen insgesamt die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten, die ansonsten zahlreichen Menschen das Leben retten könnten?

Inwieweit sollte der Steuerzahler die Last kostspieliger neuer Technologien für diejenigen tragen, die sich diese nicht leisten können?

Sollte die öffentliche Unterstützung darauf beschränkt werden, Forschungen zu finanzieren, oder auch auf klinische Anwendungen ausgeweitet werden, wenn sich diese als erfolgreich erwiesen haben?

Gentherapie ist eine kostenintensive, mit hohen Risiken behaftete Technologie, die sich nach wie vor weitgehend im Versuchsstadium befindet.

Ersetzen von Organen, künstliche Körperteile und der bionische Mensch

Nach dem gegenwärtigen System sind Organtransplantationen nur möglich, weil Menschen nach ihrem Tod ihre Organe spenden. Da sich dazu aber zu wenige freiwillig bereit erklären, sind Organe stets Mangelware. Um dieses Problem zu lösen, wurde vorgeschlagen, als Quelle für Ersatzorgane menschliche Klone zu erzeugen (im Gegensatz zur Erschaffung neuer Personen). Außerdem werden künstliche Gewebe (also nichtbiologischer Herkunft) entwickelt; vielleicht werden eines Tages sogar ganze künstliche Organe verfügbar sein. Man kann sich auch Ersatzor-

gane vorstellen, die teils aus künstlichen und teils aus natürlichen Teilen zusammengesetzt sind. Eine weitere Alternative bietet die Nanotechnologie mit technischen Entwicklungen in mikroskopischem Maßstab (s. Kap. 7). Dadurch könnten letztendlich vielleicht winzige Geräte, die mit anderen Mechanismen funktionieren, biologische Komponenten ersetzen. Beispielsweise könnten Miniaturfilter defekte Nieren ersetzen oder bei beeinträchtigtem Sehvermögen Lichtsensoren eingesetzt werden (Abb. 25.4). All diese Möglichkeiten sind bislang noch Zukunftsmusik. Gegenwärtig scheinen Stammzellen am ehesten dazu geeignet, Organe zu regenerieren (s. weiter unten).

Neue Körperteile zu schaffen und zu transplantieren ist ausgesprochen kompliziert und somit teuer. Das wirft die alte Frage auf, ob auch den Armen diese medizinische Fürsorge zuteil werden sollte. Damit in Zusammenhang steht die Frage, wie man einen begrenzten Vorrat an Ersatzorganen auf jene Menschen aufteilen sollte, die solche Organe benötigen. Derzeit werden die Organe nach Dringlichkeit und dem Prinzip „wer zuerst kommt, mahlt zuerst“ verteilt. Aber auch hier stellt sich die klassische Frage: „Wenn nur eine einzige Leber verfügbar ist, wem sollte man sie dann zuteilen: dem Alkoholiker (der sie maltärätieren wird), dem alternenden Lehrbuchautor (der seine besten Jahre bereits hinter sich hat) oder einem kleinen Kind (mit ungewisser Zukunft)?“ Solange es keinen unbegrenzten Vorrat an Organen gibt, wird diese Debatte anhalten und gute Storys für Bücher und Filme liefern.

Von den 1980er-Jahren an haben mehrere europäische Länder Gesetze für Organspenden erlassen, die von einer Einwilligung zur Spende ausgehen. Dabei wird also vorausgesetzt, dass jemand einer

Exkurs 25.1

Nanophobie und das „Gray-Goo-Szenario“

Die Entwicklung der Nanotechnologie hat unweigerlich dazu geführt, dass parallel dazu das Phänomen der Nanophobie auftrat. In frühen Artikeln über Nanotechnologie wurde vorgeschlagen, mit mikroskopisch kleinen, sich selbst replizierenden Robotern (Nanobots) Industrieprodukte und geschädigtes menschliches Gewebe aufzubauen oder zu reparieren. Daraus entwickelte sich wiederum das Szenario, die Nanobots könnten sich unkontrolliert replizieren und sämtliche verfügbaren Ressourcen konsumieren, in weitere Nanobots umwandeln und die Welt dadurch in „grauen Schleim“ (*gray goo*) verwandeln.

Tatsächlich existieren bereits Organismen, die sich in weniger als einer halben Stunde replizieren können und dies auch kontinuierlich weiter tun, bis sie sämtliche verfügbaren Ressourcen aufgebraucht haben. Es sind die Bakterien.

Vielleicht wird die Nanophobie das Denken derer, die Untergangsszenarien propagieren, ändern und von der Biologie abwenden. Dann könnten Gentechniker vielleicht etwas freier atmen und Fortschritte beim Klonen und in der Stammzellenforschung machen.

Organspende nach dem Tod zustimmt, sofern er sich nicht als Nichtspender hat registrieren lassen oder es irgendwelche anderen gegenteiligen Bescheinigungen gibt (z.B. von Verwandten). In den meisten Fällen konnte dadurch die Zahl der verfügbaren Organe deutlich erhöht werden.

Fragen:

Besteht ein ethischer Unterschied zwischen dem Klonen von Menschen, um Ersatzteile zu erzeugen, und dem Klonen zur Produktion neuer Individuen?

Stellt die Entwicklung ganzer künstlicher Organe eine gute Möglichkeit dar, um moralische Bedenken im Zusammenhang mit der Verwendung natürlicher Organe zu vermeiden? Oder wirft die Aussicht des „bionischen Menschen“ andere ethische Fragen auf?

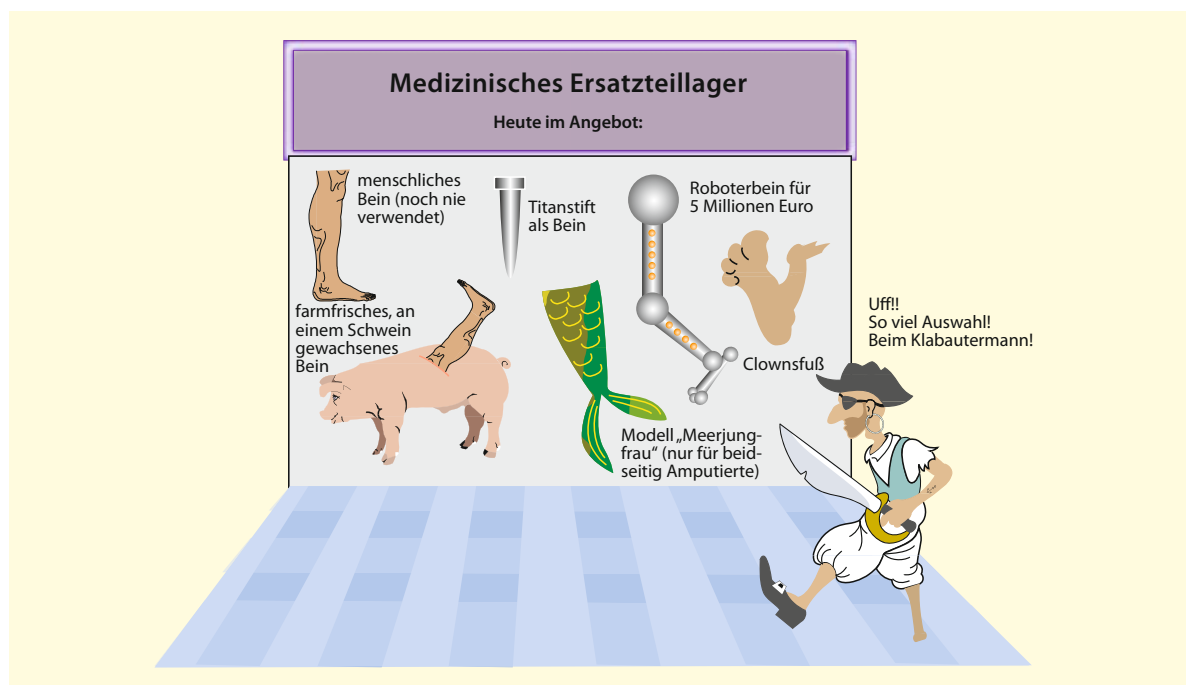
Wie sollte man aus all denen, die eine Therapie benötigen, die wenigen glücklichen Empfänger einer technischen Ressource auswählen, wenn ein Mangel an dieser Ressource herrscht?

Das Ersetzen von Organen ist ein relativ altes Problem. Neue Technologien könnten es ermöglichen, neue und verbesserte künstliche Ersatzteile zu schaffen.

Antibiotika und Wirkstoffe gegen Viren

Begegnet man Bakterien mit Antibiotika, so kann es sein, dass sie eine Resistenz entwickeln. Dies kann durch Mutation oder durch die Aufnahme mobiler genetischer Elemente wie Plasmide, Bakteriophagen und Transposons erfolgen, die bereits Antibiotikaresistenzgene enthalten. Die übermäßige und falsche Anwendung von Antibiotika hat dazu geführt, dass sich immer mehr Antibiotikaresistenzen ausgebreitet haben. Folglich wird es ständig schwieriger, wirkungsvolle Antibiotika zur Behandlung bestimmter Infektionen zu finden, deren Erreger eigentlich sensitiv für Antibiotika waren. Schätzungen zufolge sterben in amerikanischen Krankenhäusern stündlich etwa zwei Menschen (oder 17000 im Jahr) an Infektionen mit medikamentenresistenten Bakterien. Viele Dinge haben zur Ausbreitung antibiotikaresistenter Bakterien geführt, darunter auch Habgier, Unwissen und Armut.

In der Landwirtschaft werden verbreitet bestimmte Antibiotika angewendet, um das Wachstum von Nutztieren zu fördern und den Fleischertrag zu steigern. Weltweit führend im Antibiotikaverbrauch



25.4 Alternative Ersatzteile

Eine futuristische Vision möglicher Ersatzteile.

sind die Vereinigten Staaten mit zehn bis zwölf Millionen Kilogramm im Jahr 2001. Nur 10 % davon wurden zur Behandlung von Menschen verabreicht, die restlichen 90 % an Tiere. So überrascht es nicht, dass gegen solche Antibiotika resistente Bakterien mittlerweile weit verbreitet sind. Anders als in den Vereinigten Staaten wurde diese Praxis in Europa weitgehend unterbunden; hier werden nur noch 40 % der Antibiotika an Tiere verabreicht. Aufgrund dessen ging die Zahl antibiotikaresistenter Bakterien in Europa stark zurück, vor allem in Dänemark, wo die Beimischung von Antibiotika in Tierfutter völlig verboten wurde. Zudem sind die Preise für Schweinefleisch und Geflügel nicht aufgrund geringerer Fleischerträge gestiegen.

Ein weiterer Faktor, der die Entstehung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenz begünstigt, ist, dass schon bei geringfügigen Unpässlichkeiten, die womöglich noch nicht einmal von Bakterien herrühren, allzu schnell Antibiotika verschrieben werden. Hinzu kommt das Problem, dass Antibiotikabehandlungen häufig viel zu früh abgebrochen werden. Werden die infizierenden Bakterien nicht durch eine vollständige Einnahme der verschriebenen Antibiotika gänzlich vernichtet, so können die überlebenden Bakterien eine Resistenz entwickeln und sich ausbreiten. Bei unzureichender Bildung tendieren Patienten dazu, die Einnahme des Medikaments gleich nach Abklingen der Symptome abubrechen. Armut spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle. Aus Ersparnisgründen wird in armen Ländern die Dosierung der Antibiotikabehandlung häufig herabgesetzt und die Einnahmedauer verkürzt.

Ähnliche Überlegungen gelten auch für Wirkstoffe gegen Viren, beispielsweise solche zur Behandlung von Aids. In diesem Fall mutiert das Virus so rasch (s. Kap. 22), dass eine Behandlung mit nur einem antiviralen Wirkstoff mit ziemlicher Sicherheit bei den meisten Patienten zur Entstehung resistenter HIV-Mutanten führt. Daher erhalten Aidspatienten Cocktails aus mindestens drei antiviralen Wirkstoffen. Bei einer Resistenz von Mutanten gegen einen der Wirkstoffe können dann die anderen die Mutanten abtöten. Patienten, die sich die kostspieligen Cocktails nicht leisten können, werden jedoch weiterhin mit einem einzelnen Wirkstoff behandelt. Auf diese Weise können sich jeweils gegen einen Wirkstoff resistente Viren entwickeln. Werden solche HIV-Stämme auf eine andere Person übertragen, ist es möglich, dass allmählich Mehrfachresistenzen entstehen. Das Absetzen der Aidsmedikamente, wenn sich die Patienten wieder gesund fühlen, stellt eben-

falls ein ernst zu nehmendes Problem dar, insbesondere unter der armen Bevölkerung mit unzureichendem Bildungsstand. Verschärft wird die Problematik durch die hohen Kosten einer Aidstherapie sowie die umständliche Einnahme mehrerer verschiedener Tabletten zu unterschiedlichen Tageszeiten.

Fragen:

Sollte die Verwendung von Antibiotika in der Viehzucht verboten werden? Oder sollten bestimmte Antibiotika auf die Anwendung beim Menschen beschränkt werden?

Sollte die Verabreichung von Antibiotika auf Patienten mit ernsthaften Krankheiten beschränkt werden?

Sollten reiche Länder den Export bestimmter Antibiotika an arme Länder verbieten, um sicherzustellen, dass diese nicht in zu geringer Dosierung verabreicht werden.

Sollte man Menschen, die sich Medikamentencocktails gegen Aids nicht leisten können, verbieten, einen einzelnen antiviralen Wirkstoff einzunehmen, weil dadurch die Gefahr besteht, dass das Virus eine Resistenz entwickelt?

Übermäßige Verabreichung von Antibiotika hat zu immer mehr Antibiotikaresistenzen geführt. Mehrere europäische Länder haben inzwischen die Beimischung von Antibiotika in Tierfutter eingeschränkt.

Eingriffe in die Natur

Für nicht wenige Menschen, vor allem in Europa, bedeutet das Erzeugen transgener Tiere und Pflanzen eine gefährliche Einmischung in die Natur. Gewiss, der Mensch hat schon seit Tausenden von Jahren an der Natur herumgebastelt, um ertragreichere Nutztiere und Nutzpflanzen zu züchten. Heute kann man jedoch ganze Einheiten genetischer Information selbst über weite taxonomische Grenzen hinweg übertragen (z.B. von Bakterien auf Tiere oder Pflanzen), statt einfach nur aus der neu zusammengestellten genetischen Variabilität innerhalb einer Population zu selektieren oder nahe verwandte Arten miteinander zu kreuzen.

Mit transgenen Tieren und Pflanzen sowie ihren Verwendungsmöglichkeiten haben wir uns in den Kapiteln 14 und 15 befasst. Die meisten transgenen Tiere – vor allem solche, die zur Produktion klinisch oder industriell wertvoller Proteine vorgesehen sind – würden in der Natur kaum konkurrieren können.

Zudem kann man transgene Tiere recht sicher „unter Verschluss“ halten. Dagegen könnten Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Trockenheit, Krankheiten oder Schadinsekten in der Natur durchaus Vorteile haben und sich auf natürliche Weise ausbreiten. Zudem hybridisieren Pflanzen viel leichter mit verwandten Wildpflanzenarten und übertragen dadurch möglicherweise Transgene auf Wildpopulationen. Bei transgenem Mais in Mexiko hat man den Übergang von Transgenen auf verwandte Wildpflanzen bereits beobachten können. Es gibt also schon Beispiele dafür, dass gentechnisch veränderte Organismen in die Natur entkommen sind. Inwiefern sich dies auf das natürliche Gleichgewicht auswirkt, ist nicht bekannt.

Der Mensch greift schon seit Tausenden von Jahren in die Natur ein. Die Gentechnik ermöglicht jedoch viel schneller weitaus größere Veränderungen.

Transgene Nutzpflanzen

Über die Verwendung transgener Pflanzen in der Landwirtschaft sind erhebliche Debatten entbrannt. In diesem Zusammenhang wird häufig von **gentechnisch modifizierten Organismen (GMO; auch gentechnisch veränderten Organismen, GVO)** gesprochen. Dabei sollte man jedoch daran denken, dass alle domestizierten Pflanzen und Tiere durch traditionellere Methoden ebenfalls genetisch modifiziert wurden und sich folglich stark von ihren wildlebenden Vorfahren unterscheiden. Daher sollte man besser von **gentechnisch** modifizierten Organismen sprechen. Bei transgenen Nutzpflanzen sind vor allem drei Probleme zu berücksichtigen. Erstens, ob das produzierte Nahrungsmittel für den menschlichen Verzehr ungefährlich ist. Zweitens, wie man ein Entkommen in die Natur vermeiden kann. Und drittens, welche Gefahren für die Umwelt bestehen.

Transgene Pflanzen wirklich „im Zaum zu halten“, ist in der Landwirtschaft unrealistisch. Das Saatgut verschiedener Maisladungen lässt sich einfach nicht völlig voneinander trennen. So ist es schon zur Vermischung von Genmais mit natürlichem Mais gekommen (z.B. bei dem Starlink-Fall von 2000; s. Kap. 14). Man hat auch schon DNA transgener Herkunft in Wildpflanzen nachgewiesen. So enthielt beispielsweise im Jahr 2001 in Mexiko analysierter Wildmais transgene DNA, obwohl der Anbau von transgenen Maispflanzen bereits 1998 eingestellt wurde. Sorge

bereitet vor allem die Möglichkeit, dass Gene für eine Herbizidresistenz von Nutzpflanzen auf Unkräuter übergehen könnten. Das würde deren Bekämpfung erheblich erschweren. In ähnlicher Weise könnten in Pollenkörnern exprimierte Insektizidtoxine Bienen schädigen und dadurch die Bestäubung von Nutzpflanzen beeinträchtigen, die dafür auf Bienen angewiesen sind. Derartige Dinge könnten die landwirtschaftliche Produktivität deutlich verringern.

Die Perspektiven von GMO-Nahrungsmitteln variieren beträchtlich (Tabelle 25.1), sie scheinen dennoch angesichts der bekannten Interessen ziemlich vorhersehbar. Alle diejenigen, die GMO-Pflanzen anbauen, exportieren und davon profitieren, behaupten, sie seien ungefährlich und die darüber entbrannte Kontroverse sei im Wesentlichen eine emotionale Überreaktion. Ursprünglich sprachen sich sämtliche Firmen und Bauern für GMO-Pflanzen aus. Durch die Terminatordebatte entstand jedoch eine Kluft zwischen diesen beiden Gruppen (s. Exkurs 25.2). Umwelt- und Verbraucherguppen sind tendenziell – wie bei jeder neuen Technologie – eher gegen GMO eingestellt.

Fragen:

Wo sollte man die Grenze ziehen, wenn man der Meinung ist, ein Eingreifen in die Natur sei falsch, gefährlich oder sogar gotteslästerlich („Gott spielen“)?

Sollte man die Entwicklung transgener Nutzpflanzen vorantreiben, die auch unter kärglichen Bedingungen ohne den Einsatz kostspieliger Düngemittel, Insektizide, Herbizide und so weiter gedeihen, weil davon insbesondere die armen Länder profitieren würden?

Warum sollte man angesichts der Tatsache, dass fortschrittliche Nationen wie die Vereinigten Staaten mit traditionellen Anbaumethoden einen Nahrungsmittelüberschuss produzieren, nicht auf der sicheren Seite bleiben und den Anbau transgener Pflanzen vermeiden?

Tabelle 25.1 Prozentsatz genetisch manipulierter Feldfrüchte pro Gebiet (Daten von 2004)

Land	Prozentsatz
USA	59
Kanada	6
Argentinien	20
Brasilien	6
China	5
andere	4

In einigen Ländern werden verbreitet transgene Feldfrüchte angebaut, in anderen wird dies mit Argwohn betrachtet. Bedenken bestehen vor allem bezüglich der Sicherheit für den Verbraucher und die Umgebung, in der diese Pflanzen angebaut werden.

Verlust der biologischen Vielfalt

Die gentechnische Modifikation von Organismen mit anschließender Klonierung und Verbreitung zahlreicher identischer Tiere und Pflanzen wird bisweilen als Bedrohung für die natürliche Diversität angesehen. Allerdings hat der Mensch schon seit Jahrtausenden natürliche Lebensräume in künstliche Monokulturen umgewandelt. Speziell in den industrialisierten Ländern wurden die meisten natürlichen Habitate bereits durch irgendeine künstliche Umwelt ersetzt, die durch Massenproduktion oder Wiederholung charakterisiert ist. Die wirkliche Bedrohung für die biologische Vielfalt ist sicherlich die Notwendigkeit, immer mehr Gebiete unseres Planeten in Anbauflächen zur Ernährung der ständig wachsenden menschlichen Bevölkerung umzuwandeln. Das Klonen und die transgene Veränderung

domestizierter Tiere ändert an dieser Gesamtsituation herzlich wenig.

Im Gegenzug hat jedoch das neu aufkeimende Interesse an der Genetik immer stärker ins Bewusstsein rücken lassen, dass es zahlreiche Wildpflanzen und -tiere mit interessanten und nützlichen genetischen Eigenschaften gibt, die man in jetzt noch nicht absehbarer Weise nutzen könnte. Das hat wiederum zu der Erkenntnis geführt, dass die Zerstörung natürlicher Ökosysteme nach Möglichkeit vermieden werden sollte, weil diese vielleicht die Medikamente von morgen gegen Krebs, Malaria oder Fettleibigkeit beinhalten.

Die biologische Vielfalt der Erde ist durch die menschliche Landwirtschaft in Gefahr. Das Klonen von Nutztieren könnte sich schädigend auf Ökosysteme auswirken, allerdings wird das neu aufgeflamnte Interesse an Naturprodukten diesem Trend wahrscheinlich entgegenwirken.

Tierversuche

Die ethischen Bedenken im Zusammenhang mit Tierversuchen gelten für traditionelle Produkte und Arzneimittel ebenso wie für neue, gentechnisch her-

Exkurs 25.2

Terminatorgene in Saatgut

Besonders umstritten innerhalb der Kontroverse um GMO war die Entwicklung der „Terminator-Technologie“. Hierdurch wurden Nutzpflanzen gentechnisch so modifiziert, dass sie sterile Samen produzierten. Angeblich sollte dadurch die unkontrollierte Ausbreitung von GMO-Pflanzen in die Natur verhindert werden. Das eigentliche Motiv war jedoch reine Habgier. Die Landwirte waren auf diese Weise gezwungen, jedes Jahr neues Saatgut zu kaufen, statt zurückbehaltene Samen aus der Ernte des Vorjahres auszusäen. Dies erhöhte den Profit der Saatgutfirmen und machte die Farmer abhängig von ihren Saatgutlieferanten. Der Versuch, Farmer durch die Terminator-Technologie zu erpressen, hinterließ einen ziemlich bitteren Nachgeschmack.

An der Terminator-Technologie waren drei Transgene beteiligt:

1. Ein Gen für ein Toxin, das nur in sich entwickelnden Samen letal wirkt. Ansonsten ist das Toxigen inaktiv, weil zwischen dem Promotor und der codierenden

Sequenz ein DNA-Spacer, flankiert von *loxP*-Sequenzen, eingeschoben ist.

2. Ein Gen für Cre-Rekombinase (s. Kap. 14). Diese erkennt die *loxP*-Sequenzen und eliminiert durch deren Rekombination die Spacer-Sequenz. Dadurch kann das Toxigen exprimiert werden.
3. Ein Gen, das für eine Variante des TetR-Repressors codiert (s. Kap. 15). Dieser verhindert die Expression des Gens für die Cre-Rekombinase.

Vor dem Verkauf wird das Saatgut in einer Lösung aus Tetracyclin getränkt, welches an den Repressor bindet und diesen so inaktiviert. Dadurch kann die Cre-Rekombinase aktiv werden und die Spacer-Sequenz entfernen. Nun wird das Toxigen exprimiert. Da sich das Toxin nur auf die sich entwickelnden Samen auswirkt, aber nicht das Wachstum der Pflanzen beeinträchtigt, zeigen diese einen normalen Wuchs, produzieren allerdings sterile Samen.

gestellte. Dabei sollte darauf hingewiesen werden, dass für Produkttests und zur Qualitätskontrolle sehr viel mehr Tiere benötigt werden als für die eigentliche Forschung. Einerseits bedeutet jedes neue Produkt oder Verfahren auch, dass weitere Tierversuche durchgeführt werden müssen. Andererseits haben es Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie ermöglicht, dass man viele Tests heute an Zellen in Kultur durchführen kann und dafür keine lebenden Tiere mehr braucht. So kann man potenzielle Karzinogene zunächst mit einem Ames-Test analysieren; damit können mutagene Stoffe mithilfe von Bakterien nachgewiesen werden. Darüber hinaus haben Fortschritte in der Genomik und Proteomik dazu geführt, dass man nun riesige Datenmengen durch Testen der Reaktionen zahlreicher Gene in Zellkulturen sammeln kann, statt die Reaktion eines einzelnen Enzyms in einem lebenden Organismus messen zu müssen.

Vor einer Generation forderten Aktivisten, dass sämtliche Medikamente, Kosmetika, Shampoos, Nahrungsmittel und jegliche anderen Produkte, mit denen Menschen in Berührung kommen könnten, zuvor rigoros in Tierversuchen auf ihre Sicherheit getestet werden müssten. Das führte zu einer umfangreichen Gesetzgebung, die solche Tests vorschrieb. Heute fordern Tierrechtler weniger Tierversuche. Es wurde sogar schon vorgeschlagen, dass man Produkte wie Seifen und Shampoos mit bekannten Inhaltsstoffen und Eigenschaften eigentlich gar nicht mehr ständig auf ihre Verträglichkeit testen müsse. Das ist ein gutes Beispiel dafür, wie sich moralische Einstellungen im Laufe der Zeit ändern oder sogar umkehren können.

Versuche an Tieren sind ein altes ethisches Problem. Die Einstellung hierzu hat sich, speziell in jüngster Zeit, erheblich geändert.

Transgene Tiere und Klonen von Tieren

Schon seit Urzeiten hat sich der Mensch in die Natur eingemischt. Früher hat er Tiere und Pflanzen durch gezielte Zuchtwahl und Kreuzung verändert. Zudem hat menschliches Handeln zur unbewussten genetischen Veränderung vieler Organismen beigetragen. So hat der Mensch zweifellos selektiv Varianten jener Mäuse begünstigt, die über Felder und Getreidespei-

cher herfallen, sowie jener Insekten, die sich auf vom Menschen angebaute Pflanzen spezialisiert haben. Wirklich neu an der Gentechnik ist nicht, was wir machen, sondern, wie wir es machen. Heute werden transgene Organismen durch direkte Manipulation ihres genetischen Materials erzeugt.

Selbst wenn man auf einem Feld eine nicht veränderte Nutzpflanze anbaut, eliminiert man aus diesem Gebiet die dort natürlich vorkommenden Bewohner. Zudem selektiert man Lebewesen wie Unkräuter und Schadinsekten, die sich an Äcker angepasst haben. Der Maiszünsler stellt eine große Bedrohung für die Maisernte dar, würde der Mensch jedoch nicht so viel Mais anbauen, so wären diese Insekten selten. Ob wir es wollen oder nicht, ob wir uns dessen bewusst sind oder nicht: Durch all unser Tun und Handeln unterliegen auch viele andere Organismen einer genetischen Selektion.

Durch genetische Manipulation könnten in Zukunft ziemlich bizarre Organismen geschaffen werden. So wäre es beispielsweise möglich, durch Manipulation der Homöobox-Gene, die den Bauplan und die Segmentierung des Körpers steuern, Hühner mit zahlreichen Beinen und Körpersegmenten („Chickapedes“) zu kreieren. Noch grotesker wäre die Entwicklung von Tieren für die Nahrungsmittelproduktion, denen ein Gehirn weitgehend fehlt. Dadurch ließe sich vermeiden, dass Schlachttiere leiden müssen. Die Kontroverse um solche möglichen Kreationen in der Zukunft ist noch gar nicht entbrannt.

Fragen:

Sind Eingriffe in die Natur bei Tieren oder bei Pflanzen schlimmer? Bei Haustieren oder bei Nutztieren?

Sollte man Menschen erlauben, ihre Haustiere klonen zu lassen?

Ist selektive Züchtung ohne wissenschaftlichen Anspruch in Ordnung?

Ist die Anwendung der mendelschen Genetik akzeptabel?

Sind gentechnische Eingriffe vertretbar, solange keine Fremd-DNA von anderen Arten eingeschleust wird?

Wäre es akzeptabel, zur Nahrungsmittelproduktion Hühner mit zehn Beinen zu erzeugen?

Der Mensch manipuliert Tiere schon seit Tausenden von Jahren genetisch. Die transgenen Techniken ermöglichen es heute, Tiere sehr viel schneller zu verändern als durch Zuchtwahl. Die ethischen Ansichten hierüber sind sehr unterschiedlich.

Exkurs 25.3

Geklonte Haustiere auf Bestellung

Julie (Nachname auf Bitte weggelassen) aus Texas war die erste zahlende Kundin, die ein Haustier klonen ließ. Der „Zwilling“ ihres verstorbenen Katers Nicky – „Little Nicky“ getauft – wurde ihr von der Firma Genetic Savings & Clone (GSC) bei einer extra dafür veranstalteten Feier in einem Restaurant in San Francisco überreicht.

Als GSC die Übergabe am 10. Dezember 2004 bekannt gab, sorgte Little Nicky als erstes für einen zahlenden Kunden geklontes Tier für jede Menge Medienrum-

mel. „Er sieht genauso aus, hat einen extrem ähnlichen Charakter, sie sind sich wirklich sehr ähnlich“, berichtete die Auftraggeberin Julie in einem Interview für *Good Morning America* am 23. Dezember 2004. Little Nicky kam am 17. Oktober in Austin, Texas, als Klon der Maine-Coon-Katze Nicky zur Welt, die im November 2003 im Alter von 17 Jahren verstorben war.

Im Dezember 2006 stellte GSC aufgrund mangelnder Nachfrage den Betrieb ein.

Transgene Tiere für Kunst und Vergnügen

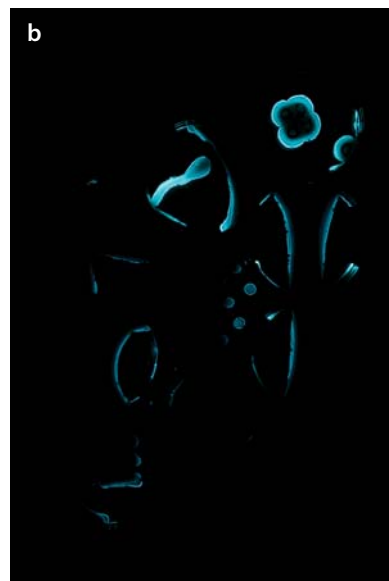
Eine ziemlich alberne Anwendung der Biotechnologie ist das Erzeugen transgener Tiere aus künstlerischen Gründen – als Kunstform unter der Bezeichnung „**Transgenic Art**“ bekannt. Der Einbau des Markergens *gfp*, das für das grün fluoreszierende Protein (GFP) codiert, ist mittlerweile Routine in der Gentechnik. Zunehmend werden auch weitere, in anderen Farben fluoreszierende Proteine verwendet. Grün leuchtende Tiere sind daher heute schon recht verbreitet. Bei Tageslicht sehen diese Tiere normal aus, bestrahlt man sie jedoch im Dunkeln mit blauem oder nahezu ultraviolettem Licht, so fluoresziert das

ganze Tier grün. Damit die Farbe deutlich erkennbar wird, muss man Tiere mit weißem Fell oder nackter Haut verwenden. Bei Albinostämmen von Mäusen oder Kaninchen zeigt sich der Effekt beispielsweise gut, bei Tieren mit dunklem Fell bleibt die grüne Fluoreszenz dagegen verborgen.

Alba, das Leuchtkaninchen („GFP-Bunny“), wurde als echtes transgenes Kunstwerk angekündigt. Zur Welt kam Alba im Frühjahr 2000 in Frankreich. Es war ein transgenes Albinokaninchen, das große Mengen GFP exprimierte. Die ganze Angelegenheit ist heftig umstritten. Der Künstler Eduardo Kac behauptet, Alba sei auf sein Geheiß hin erzeugt worden, während die Wissenschaftler erklärten, sie sei zu Forschungszwecken geschaffen und nicht an den Künstler freigegeben worden. Was wäre, wenn demnächst

25.5 Genkunst: Pflanzen-embryo, Stadien 1 und 5

Hunter O'Reilly kreiert mithilfe von leuchtenden Bakterien kontrollierte Strichzeichnungen. Die Bakterien auf den Bildern werden in bestimmten Abständen fotografiert. Zunächst hell leuchtend, verblassen sie im Laufe von zwei Wochen immer mehr, wenn die Nährstoffe aufgebraucht sind. Mit freundlicher Genehmigung von Hunter O'Reilly (<http://www.artbyhunter.com/artgallery/livingbacterialdrawings/index.html>).



rot und grün fluoreszierende Mäuse als Haustiere für Kinder oder gar als Weihnachtsschmuck vermarktet würden? Oder rote, weiße (also nichttransgene) und blaue Mäuse aus patriotischen Gründen? Wird die NASA ein rot, weiß und blau gefärbtes Rhesusaffentrio in den Weltraum schicken? Genkunst mit Bakterien wurde vor kurzem ebenfalls ausgestellt (Abb. 25.5).

Schon seit langem hat der Mensch Tiere für Kunst und Unterhaltung gezüchtet. Viele Hunderasen fallen in diese Kategorie, auch einige andere Tiere werden zu Schauzwecken gezüchtet, und nicht als Nahrungslieferanten oder Arbeitstiere. Die transgene Technologie hat diesen Prozess lediglich beschleunigt und drastischere Änderungen ermöglicht als die traditionellen Methoden der Kreuzung.

Frage:

Sollten transgene Techniken auf „ernst zu nehmende“ Gebiete wie Gesundheitsfürsorge und Landwirtschaft beschränkt werden?

Transgene Techniken können auch zu relativ trivialen Zwecken wie Kunst oder Unterhaltung eingesetzt werden. Das scheint weniger gerechtfertigt als die Verbesserung von Nutztieren.

Veränderung der menschlichen Keimbahn

Genetische Untersuchungen in der Schwangerschaft und Schwangerschaftsabbruch

Seit einiger Zeit werden routinemäßig genetische Untersuchungen an Neugeborenen durchgeführt. Die dadurch erlangten Informationen ermöglichen im Bedarfsfall eine frühzeitige Behandlung der Babys. Das klassische Beispiel hierfür ist Phenylketonurie (PKU). An PKU Erkrankten fehlt das Enzym, das Phenylalanin in Tyrosin umwandelt. Die überschüssigen Mengen Phenylalanin führen zu dauerhaften Hirnschäden (s. Kap. 16). Wird beim Neugeborenen-Screening PKU festgestellt, so können die betroffenen Säuglinge eine Phenylalanin-arme Ernährung erhalten; dadurch lassen sich Schädigungen weitgehend verhindern. Seit einiger Zeit kann man Feten

sogar schon lange vor der Geburt auf verschiedene genetische Störungen testen. Die Analysetechniken werden ständig fortschrittlicher, und immer mehr Erbkrankheiten können auf diese Weise in immer früheren Entwicklungsstadien nachgewiesen werden.

Pränatale genetische Untersuchungen können jedoch auch durchgeführt werden, um im Fall einer Erbkrankheit entscheiden zu können, ob ein Schwangerschaftsabbruch vorgenommen werden soll. Da das Verständnis des menschlichen Genoms wächst, wird es irgendwann möglich sein, auch Dinge wie die spätere Körpergröße, die Augenfarbe, den IQ und die Attraktivität des sich entwickelnden Fetus abzuleiten. Weil die meisten Eltern gerne intelligente, gesunde und hübsche Kinder hätten, wird die Versuchung, wegen dieser Merkmale einen Schwangerschaftsabbruch durchführen zu lassen, in Zukunft größer werden.

Die Abtreibungsproblematik ist speziell in den USA schon fast eine Obsession. In den meisten europäischen Ländern wurden Schwangerschaftsabbrüche in den 1950er-Jahren gesetzlich erlaubt, und nur wenige Europäer nehmen die moralischen Äußerungen von jenseits des Atlantiks ernst. Die zentrale Frage der Abtreibungsproblematik lautet: „Wann beginnt das menschliche Leben?“ Aus biologischer Sicht beginnt das Leben nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt, sondern ist vielmehr ein Kontinuum. Spermienzellen sind ebenso lebendig wie die Eizellen, die sie befruchten. Durch die Verschmelzung von Eizelle und Spermium entsteht eine Zygote und damit ein neues lebendes Individuum mit einzigartiger genetischer Ausstattung. Vielleicht stellt sich weniger die Frage nach dem Beginn des Lebens als vielmehr nach dem Bewusstsein. Ab wann werden wir wirklich zu bewussten Lebewesen? Diese Frage ist aber unmöglich zu beantworten, weil bislang noch niemand weiß, was Bewusstsein genau ist, geschweige denn in der Lage ist, es irgendwie zu messen.

Da die Gesellschaft willkürlich festgelegt hat, dass Schwangerschaftsabbrüche bis zum Ende des ersten Trimesters legal sind, wer sollte dann entscheiden, ob ein Abbruch durchgeführt werden sollte? Aus genetischer Sicht tragen Vater und Mutter gleich viel zu dem neuen Individuum bei – abgesehen von der mitochondrialen DNA, die ausschließlich von der Mutter stammt. Im Hinblick auf die biologischen Ressourcen hat die Mutter mehr investiert. Daher durfte traditionell sie die Entscheidung treffen. Der Vater hat also häufig weniger Rechte über die Kinder. Diese Anschauung basiert zwar nicht absichtlich auf evolutionären Erwägungen, deckt sich aber tatsächlich mit der darwinschen Logik.

Fragen:

Sind die Ansichten der Europäer zum Schwangerschaftsabbruch (und ähnlichen Themen) fortschrittlicher oder abartiger als die Einstellungen der Amerikaner?

Sollten pränatale genetische Untersuchungen auf Erbkrankheiten erlaubt sein?

Sollte man bei Feststellung eines Erbdefekts beim Fetus einen Schwangerschaftsabbruch durchführen? Wer sollte die Entscheidung treffen, ob ein solcher Fetus weiterleben oder sterben soll?

Sollte man bei Entscheidungen, die das Wohlergehen eines Kindes betreffen, Vaterschaftstests verlangen, um sicherzustellen, dass auch wirklich die echten genetischen Eltern des Kindes verständigt werden?

Genetische Untersuchungen von Feten und Neugeborenen werden schon vielfach und immer häufiger durchgeführt. Es ist schwierig zu entscheiden, wie man die dabei gewonnenen Erkenntnisse anwenden soll.

Stammzellenforschung

Ein weiteres Problem, das teilweise mit der Abtreibungskontroverse vermischt wurde, betrifft die Stammzellenforschung. Stammzellen sind die Vorläufer der differenzierten Zellen, aus denen der Körper aufgebaut ist. Für die verschiedenen Gewebetypen gibt es jeweils unterschiedliche Formen von Stammzellen. Aus den bei Embryonen vorhandenen embryonalen Stammzellen können sich noch sämtliche Zellen des Körpers entwickeln. Embryonale Stammzellen kann man in Zellkultur züchten und durch den Einbau von DNA transgene Tiere erzeugen.

Man hofft, mit modifizierten Stammzellen eines Tages geschädigte Körpergewebe oder Organe regenerieren zu können. Kontrovers diskutiert wird unter anderem die Bezugsquelle der embryonalen Stammzellen, vor allem, ob man sie von abgetriebenen Feten entnehmen darf. Die Vertreter der einen Seite behaupten, die Stammzellenforschung werde Schwangerschaftsabbrüche fördern, nur um genügend Material zur Verfügung zu haben. Vertreter der anderen Seite argumentieren, diese Forschung einzustellen bedeute, den Patienten medizinische Verbesserungen wie das Ersetzen defekter Organe vorzuenthalten. Ähnlich umstritten ist die Verwendung von Stammzellen aus überzähligen Embryonen in Befruchtungskliniken. Da für die Forschung nur wenige Stammzellen benötigt werden und bereits in großer

Zahl Feten aus Schwangerschaftsabbrüchen zur Verfügung stehen, ist es eher unwahrscheinlich, dass die Zahl der Abtreibungen deswegen ansteigen wird. Zudem hat bislang noch niemand aus einer Stammzelle ein vollständiges menschliches Organ erzeugt. Damit basiert diese Kontroverse auf Eventualitäten, nicht auf der Realität. Wenn die Technologie irgendwann weit genug fortgeschritten ist, um Organe in Kultur zu züchten, wird es vermutlich auch möglich sein, Stammzellen vom Körper des Patienten selbst zu verwenden, sodass kein embryonales Gewebe mehr benötigt wird.

Die Stammzellenforschung spielt auch in andere Gebiete der Biotechnologie hinein. Dürfen Wissenschaftler ihre „eigenen“ Embryonen *in vitro* erzeugen, wenn es ihnen nicht erlaubt ist, vorhandenes Gewebe von Aborten zu verwenden? Darf Gehirngewebe verwendet werden, denn dort sitzt ja nach allgemeiner Ansicht das Bewusstsein?

Fragen:

Sollten alle Forschungen an embryonalen Stammzellen erlaubt sein?

Sollte es Wissenschaftlern erlaubt sein, nach Schwangerschaftsabbrüchen den Feten embryonale Stammzellen zu entnehmen, oder sollten sie lediglich bereits existierende Stammzelllinien weiter kultivieren dürfen?

Was wäre, wenn Forscher in weniger repressiven Ländern als den Vereinigten Staaten weiterhin Stammzellenforschung betrieben und es ihnen dabei gelänge, neue Therapien zu entwickeln? Dürften die Amerikaner dann diese Therapien in Anspruch nehmen und davon profitieren?

Die Verwendung von Stammzellen hat Bedenken hinsichtlich der Unantastbarkeit des Lebens aufgeworfen und zu einer erhitzten Kontroverse geführt. Die Einstellungen und Regelungen hierzu sind in verschiedenen Ländern sehr unterschiedlich.

Klonen von Menschen

Ein weiteres umstrittenes Thema ist das Klonen von Menschen. Die Technik des Klonens von Tieren wurde bereits erläutert (Kap. 15), und es wurden auch schon einige ethische Fragen im Zusammenhang mit dem Klonen von Tieren angesprochen (s. weiter vorne). Das Klonen von Menschen gilt verständlicherweise generell als ethisch weniger vertretbar als das Klonen von Tieren. Für Menschenklone gäbe

es zwei Anwendungsmöglichkeiten. Zum einen das Erzeugen neuer, mit dem Spender der genetischen Information identischer Individuen. Zum anderen die Produktion neuer Organe und Gewebe, um damit defekte zu ersetzen.

Die technischen Probleme beim Klonen wurden bereits in Kapitel 15 diskutiert. Angenommen, diese seien gelöst und Klonen sei sicher und zuverlässig möglich, gäbe es dann irgendeinen Grund, das Klonen von Menschen zu verbieten? Es wurde beispielsweise angeregt, dass Eltern ein Kind ersetzen könnten, das früh verstorben ist. Diktatoren könnten für Notfälle einige Klone als Sicherungskopien bereithalten. Allerdings müssten die geklonten Menschen von einer Leihmutter ausgetragen werden. Erst nach vielen Jahren, nach Durchlaufen einer ganz normalen Entwicklung, würden sie das Erwachsenenalter erreichen. Die Vorstellung, Personen einfach durch geklonte Kopien zu ersetzen, würde also durch eine starke zeitliche Verzögerung erschwert. Darüber hinaus wären die Klone zwar genetisch identisch, wären jedoch aufgrund von Umwelt- und Entwicklungseinflüssen keine echten „Verhaltenskopien“. In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, dass eineiige Zwillinge ebenfalls genetisch identisch sind – sozusagen natürliche „Klone“ –, in ihrer Persönlichkeit, ihrem Verhalten und ihren Fähigkeiten aber dennoch erheblich voneinander abweichen.

Das Klonen von menschlichen Körperteilen als Ersatzteile erscheint den meisten Menschen mittlerweile weniger verwerflich. Dabei könnte es sich in der Praxis als schwieriger erweisen, denn dazu wären Modifikationen erforderlich, damit sich keine vollständigen Menschen entwickeln. Insbesondere müsste man, wahrscheinlich durch starke Einschränkung der Gehirnentwicklung, menschenähnliche Wesen ohne Bewusstsein erzeugen. Wird irgendwann jeder von uns einen hirnlosen Sicherheitsklon als Ersatzteillager im Keller haben? Oder wird es eine zentrale Einrichtung geben, die generische Klone ohne Kopf, mit verlängertem Körper und 20 Nieren erzeugt? Etwas nüchterner betrachtet macht die prognostizierte Möglichkeit, Organe aus Stammzellen zu regenerieren, das Klonen zur Bereitstellung von Ersatzteilen überflüssig.

Würden solche Geschöpfe erschaffen, was käme dann als nächster Schritt? Die Nutzung der geklonten Menschen ohne höheres Bewusstsein als Nahrung? Durch einen solchen Kannibalismus ließe sich vermeiden, Tieren Schaden zuzufügen, und man könnte stets Nahrung der genau richtigen Zusammensetzung bereitstellen. Das mag sehr bizarr klingen, man

denke aber beispielsweise daran, dass über die Azteken spekuliert wurde, sie hätten aus Gründen der Ernährung (nicht aus kulturellen Gründen) Kannibalismus praktiziert, und zwar in einem so großen Umfang, dass dies einen Großteil ihrer Ernährung ausmache – zumindest der Oberklasse. Auch dies ist natürlich umstritten, da keine exakten Zahlen über die Gesamtbevölkerung und die Zahl der Opfer vorliegen. Inzwischen ergab sich eine interessante neue Wendung: Wie gezeigt werden konnte, hat eine fast ausschließlich aus Mais bestehende Ernährung im Gehirn von Ratten einen Serotoninmangel zur Folge. Eine geringe Serotoninkonzentration konnte sowohl bei Versuchstieren als auch bei Menschen mit eigenartigem, gewalttätigem Verhalten in Zusammenhang gebracht werden. Daraus hat man den Schluss gezogen, dass die maisreiche Ernährung den Kannibalismus bei den Azteken gefördert hat. Es ist also vorstellbar, dass die moralische Einstellung durch die Ernährung beeinflusst wird!

Fragen:

Angenommen, alle technischen Probleme seien gelöst, wäre es dann akzeptabel, durch Klonen neue Menschen zu erzeugen?

Ist Kannibalismus an sich unmoralisch oder bestimmt die Herkunft des Leichnams (Opferung, Ermordung, Klonen von Wesen ohne Gehirn) die moralische Einstellung?

Ist es unmoralisch, sich nur von bestimmten Nahrungsmitteln zu ernähren, wenn überzeugend bewiesen ist, dass diese ein nicht akzeptables Verhalten fördern?

Das Klonen von Menschen ist sehr umstritten. Dabei gibt es unterschiedliche Ansichten bezüglich der beiden Formen: reproduktives Klonen zum Erzeugen neuer Individuen und therapeutisches Klonen von Organen als Ersatzteile.

Eugenik und selektive Züchtung

Männer machen sich im Allgemeinen mehr Gedanken über die Züchtung ihrer Pferde und Hunde als über das Aufziehen ihrer Kinder.

William Penn, 1693

Wenn es darum geht, „Gott zu spielen“, ist es das höchste Ziel, Menschen nicht einfach nur zu klonen, sondern sie auch noch genetisch zu verbessern – also Franksteins Monster in der Gestalt des 21. Jahrhunderts. In fiktiven Geschichten weisen die

erzeugten Menschen stets einen unvorhergesehenen, fatalen Fehler auf (bei Franksteins Monster ist es eine übertriebene Angst vor Feuer). Das soll implizieren, dass wir einfach noch nicht genügend wissen, um solche Manipulationen gefahrlos durchführen zu können, und deshalb besser unsere Finger von solchen Eingriffen in die Natur lassen sollten. Ein weiteres, vor allem in zweitklassigen Filmen ständig wiederkehrendes Thema ist das Auftauchen einer Gruppe überlegener Menschen, oft mit besonderen übernatürlichen Kräften ausgestattet, mit höherer Intelligenz und mehr Muskeln. Manchmal entstehen diese, weil sie zufällig irgendeiner Strahlung ausgesetzt waren, manchmal sind sie das Ergebnis einer mysteriösen „Aufwärtsevolution“, und manchmal werden sie auch durch absichtliche Zuchtwahl oder gentechnische Eingriffe erzeugt. Normalerweise löscht der Held des Films diese Supermenschen einfach aus, was vermutlich zeigen soll, dass es moralisch vorzuziehen ist, schwächer und weniger intelligent zu sein.

Gelegentlich wurden unausgereifte Versuche auf dem Gebiet der Eugenik – der absichtlichen genetischen Verbesserung der menschlichen Spezies – unternommen. So trieb beispielsweise zwischen den beiden Weltkriegen die amerikanische Eugenikbewegung die Sterilisierung von geistig Minderbemittelten und Gewaltverbrechern voran. Solche Maßnahmen beruhten auf einer selektiven Fortpflanzung (wie sie schon seit Jahrhunderten bei domestizierten Tieren erfolgte), nicht auf gentechnischen Eingriffen.

Gegner der modernen Gentechnik weisen häufig auf diese alten Eugenikprogramme hin. Auch wenn es in solchen Diskussionen nur selten erwähnt wird: Die soziale Unterstützung von Menschen, die ihre eigenen Kinder nicht ernähren können, beeinflusst ebenfalls die künftige genetische Zusammensetzung der Art. Fürsorge kann zu einem Anstieg der Zahl abhängiger Menschen führen, die selbst zur Gesellschaft als Ganzes keinen Beitrag leisten. Daher wirkt sich fast jede größere gesellschaftliche oder politische Veränderung auf den menschlichen Genpool aus. Jede größere Epidemie begünstigt alle diejenigen, die resistenter gegen diese Krankheit sind, es findet also eine genetische Selektion der davon betroffenen menschlichen Population statt. Inzwischen hat man im menschlichen Genom schon mehrere Mutationen gefunden, die eine Resistenz gegen verschiedene virulente Infektionskrankheiten (wie Pocken, Malaria, Ruhr/Cholera) verleihen (s. Kap. 16).

Auch kulturelle Veränderungen hatten Mutationen und Selektion zur Folge. So führte beispielsweise die Domestizierung von Rindern zu genetischen Veränderungen bei den Menschen, die ihre Lebensweise an die Viehzucht anpassten. Der in Kuhmilch enthaltene Zucker Lactose (Milchzucker) wird von dem Enzym Lactase gespalten. Ursprünglich wurde das Gen für Lactase beim Menschen nur im Säuglingsalter exprimiert. In der modernen Zivilisation, in der auch Erwachsene große Mengen Milch trinken, wird Lactase auch im Erwachsenenalter exprimiert. Grundlage hierfür ist ein Basenaustausch von T zu

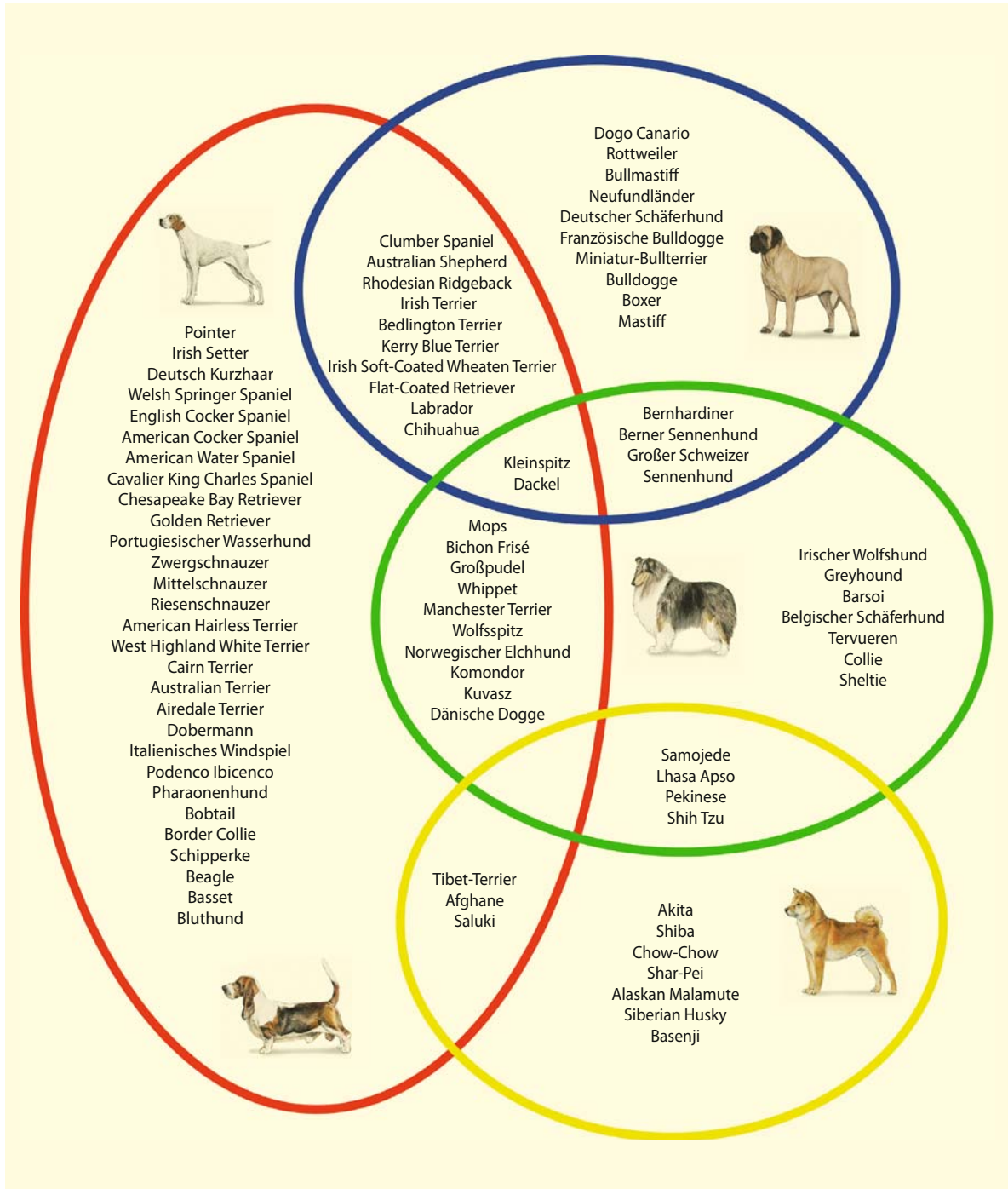
Exkurs 25.4

Eugenik oder Dysgenik?

Die Napoleonischen Kriege lieferten ein interessantes, aber unabsichtliches Beispiel für Dysgenik (negative Eugenik). Napoleon, selbst von ziemlich kleiner Statur, zog gezielt große Männer in die französische Armee ein. Obwohl Napoleon viele Kriege gewann, waren zahllose Todesopfer zu beklagen, und selbst bei siegreichen Kriegen verlor er häufig mehr Männer als seine Feinde, weil er seine Soldaten in tief gestaffelten Schlachtreihen aufstellte. Häufig durchbrachen Kugeln und Granaten die erste Reihe und töteten auch Männer in den hinteren Reihen. Da für die Armee stets große Männer ausgewählt wurden und davon viele zu Tode kamen, ging die durchschnittliche Körpergröße der Franzosen in der folgenden Generation deutlich zurück!

Seit Beginn der Industrialisierung haben Wohlfahrtsprogramme dafür gesorgt, dass auch arme Menschen

Kinder aufziehen konnten. Andererseits hat die enorme Bevölkerungsdichte aufgrund der Urbanisierung sehr zur Ausbreitung von Infektionskrankheiten beigetragen, vor allem bei der armen, unter beengten Verhältnissen lebenden Bevölkerung. War dies eine Selektion zugunsten oder gegen die weniger Bemittelten? Das weiß keiner so genau. Allerdings ändert sich durch ein solches Handeln der menschliche Genpool, ob man das nun zugeben möchte oder nicht. Heute verfügen wir nicht nur über bessere technische Möglichkeiten für Untersuchungen auf Gendefekte, sondern auch zur künstlichen Manipulation einzelner Gene und ganzer Organismen. Werden wir dieses Wissen sensibel nutzen? Oder wird dieses Problem ein Tabu bleiben, während wir weiterhin auf eher zufällige Weise gesellschaftliche Veränderungen herbeiführen, die unser genetisches Erbe ändern?



25.6 Populationsstruktur der Hunderassen

Von jeder der 85 Hunderassen hat man anhand von VNTRs – 96 Mikrosatelliten mit Dinucleotidwiederholungen vom Typ (CA)_n – den Genotyp von fünf nicht miteinander verwandten Individuen erstellt. Die VNTRs kamen im Genom der Hunde in einer durchschnittlichen Dichte von 30 Megabasen vor. Dabei ergab sich, dass es vier genetisch verwandte Hauptgruppen gibt, hier wiedergegeben durch die farbigen Kreise, dazu verschiedene dazwischen stehende Rassen. Aus Parker und Ostrander (2005) *Canine genomics and genetics: Running with the pack. PLoS Genet* 1: e58. Lizenzfrei und mit freundlicher Genehmigung von Elaine Ostrander.

C in einer regulatorischen Sequenz, ungefähr 14 kb strangaufwärts des Strukturgens, das für Lactase codiert. Die Milchwirtschaft hat also zur Selektion der Lactaseexpression bei Erwachsenen geführt. All jene Menschen, welche die neue Nahrungsquelle effizient nutzen konnten, hatten einen Selektionsvorteil. Solche genetischen Veränderungen entstanden als unbeabsichtigte Folgeerscheinungen kultureller Entwicklungen. Ob wir uns dieser Veränderungen bewusst sind oder nicht: Der Mensch verändert sich genetisch ständig selbst.

Um auf den besten Freund des Menschen zurückzukommen: Abbildung 25.6 veranschaulicht die bemerkenswerten Veränderungen, die auch ohne die Hilfe der Gentechnik alleine durch selektive Züchtung hervorgebracht wurden.

Fragen:

Eines der wesentlichen Probleme bei der Eugenik ist die Kontrolle. Wer sollte die Entscheidungen bei einer gezielten genetischen Selektion treffen, die Regierung oder der Einzelne?

Ist es falsch, Gewaltverbrechern eine Verkürzung der Strafe anzubieten, wenn sie einer Sterilisierung zustimmen?

Ist es falsch (eine „unzulässige Einmischung“), geistig Minderbemittelten nahe zu legen, besser auf Kinder zu verzichten?

Ist es ethisch nicht vertretbar, Menschen mit „unzureichender (darwinscher) Fitness“ zu sterilisieren? Ist es vertretbar, einen Anstieg der Zahl dieser Menschen durch Fürsorge zu fördern und dabei die genetischen Auswirkungen bewusst zu ignorieren?

Sollten wir versuchen, die menschliche Spezies durch gezielte gentechnische Eingriffe zu „verbessern“? Wenn ja, wer sollte dann entscheiden, welche „Verbesserungen“ dies sein sollen?

Transgene Menschen und Designerbabys

Zukünftige Technologien könnten es ermöglichen, Menschen durch Auswahl bestimmter Varianten menschlicher Gene gezielt zu verändern (z.B. Gene für Krankheitsresistenz, höhere Intelligenz, blaue Augen). Auf einfache Weise ist dies bereits heute möglich, etwa – wie bereits erwähnt – durch Abtreibung unerwünschter Feten nach einer genetischen Analyse. Durch transgene Technologien wird man

vielleicht irgendwann in der Lage sein, gezielt Nachkommen mit bestimmten Merkmalen zu erzeugen.

Eine solche Technologie würde auch den Einbau von Fremd-DNA in das menschliche Genom ermöglichen, man könnte also transgene Menschen erzeugen. Die meisten Eltern hoffen, dass sich ihre Kinder gut entwickeln. Deshalb kann man sich ohne Weiteres vorstellen, dass Eltern auch „neue und verbesserte“ Kinder möchten, sofern dies möglich ist. Es wurde bereits darauf eingegangen, dass Tiere gentechnisch so modifiziert wurden, dass sie ihre eigenen essenziellen Aminosäuren herstellen und man ihnen diese daher nicht mit dem Futter bereitstellen muss (s. Kap. 15). Wie steht es mit dem Kampf gegen Unterernährung und Vitaminmangel beim Menschen durch den Einbau von DNA, welche für die Synthesewege essenzieller Aminosäuren oder Vitamin C codiert? Man könnte sich auch vorstellen, dass sich irgendwelche verrückten Leute Kinder mit neuartigen oder kosmetischen genetischen Verbesserungen wünschen, die von nichtmenschlichen Lebensformen stammen. Werden irgendwann grün fluoreszierende Kinder die bereits erwähnte Liste der GFP-Organismen fortsetzen?

Durch gentechnische Manipulation lassen sich nicht nur defekte Gene ersetzen, sondern auch Gene anderer Organismen einbauen. Würden diese Techniken auch auf Menschen angewandt, kann man sich die daraus entstehenden Kontroversen jetzt schon vorstellen.

Wissen, Identität und Ideologie

Privatsphäre und persönliche genetische Informationen

Irgendwann wird es auch möglich sein, durch Analyse der DNA einer Person zukünftige gesundheitliche Probleme vorherzusagen. Gegenwärtig gilt dies nur für einige wenige Erbkrankheiten, zumeist mit schweren, deutlich erkennbaren Auswirkungen. Solche Informationen könnten nicht nur für die Betroffenen von Interesse sein (s. weiter unten), sondern auch für das Gesundheitswesen, Versicherungsunternehmen, Arbeitgeber, das Militär und so weiter. Das wirft die Frage nach der Verletzung der Privatsphäre auf.

Planetary Security

Issued 04-25-07
Expires Death

Alisa Bustamante

Amelogenin	Y	X	D7S820	22	28
D3S1358	12	8	D16S539	13	18
TH01	14	23	CSF1PO	8	10
D21S11	11	18	vWA	5	6
D18S51	4	9	D8S1179	17	19
D5818	7	7	TPOX	8	11
D13S317	17	19	FGA	10	12



25.7 Genetischer Personalausweis

Für forensische Analysen entspricht das auf einem Dutzend STR-Sequenzen beruhende DNA-Fingerprinting dem aktuellen Stand der Technik. Der Amelogenin-Marker dient zur Geschlechtsbestimmung. Mit einem solchen Fingerprinting lassen sich mehr als 100 Millionen (10^{14}) Menschen individuell unterscheiden.

Exkurs 25.5

Gendoping: ein Dilemma der Zukunft?

Die Entwicklung von transgenen Mäusen mit besonderen Fähigkeiten (Mighty Mouse, Marathon-Maus – s. Kap. 15) hat Begehrlichkeiten bei einigen Menschen geweckt. Könnten solche Leistungssteigerungen auch bei menschlichen Sportlern möglich sein? Auf diesem Gebiet arbeitende Forscher haben bereits einige Anfragen von Sportlern bezüglich einer Kräftigung der Muskulatur erhalten.

Mit dem Begriff *Gendoping* bezeichnet man die Bereitstellung zusätzlicher Genkopien, die einen Wettbewerbsvorteil verschaffen (im Gegensatz beispielsweise zum Doping mit verbotenen Steroiden). Möglichkeiten wären

zum Beispiel eine größere Muskelmasse, eine erhöhte Ausdauer oder eine höhere Zahl roter Blutkörperchen. Die zusätzlichen Proteine wären den körpereigenen sehr ähnlich oder sogar identisch und damit enorm schwierig nachzuweisen.

Gegenwärtig ist Gendoping noch Zukunftsmusik. Angesichts der Geschwindigkeit der wissenschaftlichen Entwicklung und der Bereitschaft der Athleten, leistungssteigernde Medikamente auszuprobieren, auch wenn diese verboten sind, könnte diese Problematik allerdings schon recht bald Wirklichkeit werden.

Hat eine Krankenkasse das Recht, über potenzielle künftige gesundheitliche Probleme ihrer Mitglieder informiert zu sein? Anbieter von Lebensversicherungen achten heute schon auf Alter, Gewicht und Cholesterinspiegel und verlangen von Risikopatienten höhere Prämien. Wie werden die Versicherungsunternehmen reagieren, wenn man Menschen mittels eines genetischen Screenings auf sämtliche gesundheitlichen Probleme hin untersuchen kann? Natürlich werden die Versicherungsfirmer den meisten Menschen eine Versicherung anbieten müssen, um im Geschäft zu bleiben, aber wie groß werden die Unterschiede bei den Beiträgen aufgrund der genetischen Daten sein?

Eine weitere Problematik, die ebenfalls die Privatsphäre betrifft, sind nationale Datenbanken des Gesundheitswesens. (Man denke nur daran, dass Datenbanken für verurteilte Verbrecher, vor allem Sexu-

alverbrecher, heute schon in vielen Ländern geführt werden.) Damit könnten sich angehende Ehepartner über mögliche Erbkrankheiten informieren, die bei einer bestimmten Elternkombination auftreten könnten. Ebenfalls vorgeschlagen wurde schon ein auf der DNA beruhender Ausweis, der nicht nur die persönliche Identität dokumentiert, sondern auch für Notfälle nützliche Daten zur persönlichen Gesundheit (wie Allergien und Informationen zur Blutgruppe) enthält (Abb. 25.7). Wie wird sich dies auf die Rolle des Staates in unserem Leben auswirken?

Fragen:

Wie viel persönliche genetische Information sollte dem Gesundheitswesen, Versicherungsunternehmen, Regierungen, Arbeitgebern, Ehepartnern und so weiter zur Verfügung stehen?

Wird unsere „genetische Identität“ zu einem ähnlich alltäglichen Gut werden wie unsere finanzielle Identität? Werden Menschen genetische Ausweise stehlen, um niedrigere Lebensversicherungsbeiträge, einen hochwertigeren Partner oder eine gute Stelle zu erhalten?

Die Einmischung in die Privatsphäre ist schon ein altes Problem. Da immer mehr DNA-Sequenzdaten verfügbar werden, stellt sich jedoch die Frage, wie man die genetische Identität besser schützen kann.

Vorgewarntsein oder Unkenntnis

Ist es ein Segen, nichts über die Zukunft zu wissen, oder ist es besser, durch Vorwarnung gewappnet zu sein? Durch genetische Analysen von Erwachsenen, Kindern oder Ungeborenen kann man feststellen, ob sie eine Erbkrankheit haben. Bedauerlicherweise gibt es für sehr viele dieser Krankheiten keine Heilung. Angenommen, in einer Familie ist bereits mehrmals eine Erbkrankheit aufgetreten – sollte man dann die Kinder untersuchen lassen und sie über die Ergebnisse informieren? Gesetzt den Fall, ein Kind erbt mit einer Wahrscheinlichkeit von 50:50 eine erbliche Störung, deren Symptome erst spät im Leben auftreten, aber schwere Schädigungen hervorrufen. Sofern das Kind diesen Defekt nicht hat, wird es vermutlich ausgesprochen erleichtert sein, das zu wissen. Wenn es jedoch Träger des genetischen Defekts ist, wird es dann mit dem Wissen leben wollen, irgendwann im späteren Leben schwerstkrank zu werden? Oder wäre es ihm lieber, das nicht zu wissen? (Man kann nicht eine Analyse durchführen, und den unglücklich Betroffenen das Ergebnis vorenthalten: Nicht informierten Patienten wäre schnell klar, dass sie den Defekt haben.) Beispiele für solche Fälle sind relativ selten, am bekanntesten ist wohl Chorea Huntington (s. Kap. 16).

Aus mehreren Gründen ist es vielleicht besser, es zu wissen:

1. Man könnte dafür sorgen, dass der Defekt nicht weitervererbt wird, indem man auf eigene Kinder verzichtet.
2. Medizinische Fortschritte könnten in der Zukunft eine Heilung ermöglichen, von der man profitieren könnte, sofern man Bescheid weiß.
3. Man könnte sein Leben so planen, dass es möglichst stressfrei verläuft.

4. Wenn man nicht wüsste, ob man Träger ist oder nicht, würde man sich dennoch Sorgen machen.

Fragen:

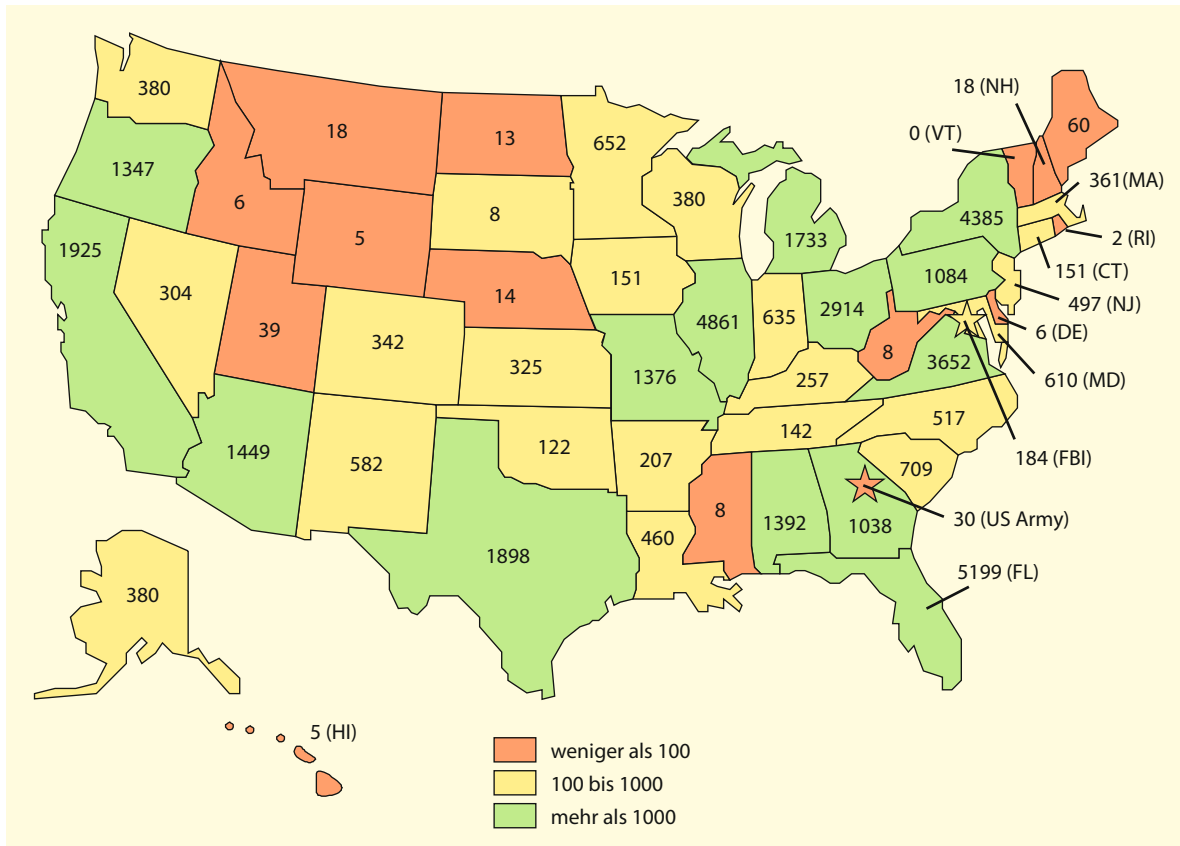
Sollte man genetische Informationen dazu nutzen, noch vor Auftreten irgendwelcher Symptome seine Partnerschaft und berufliche Karriere zu planen und der Gesundheit dienliche Entscheidungen zu treffen (z.B. in ein Gebiet mit günstigerem Klima umziehen, um mögliches Asthma zu vermeiden)?

Bei genetischen Analysen können schwere Erbkrankheiten ans Licht kommen, die nicht heilbar sind. Sollte man darüber informiert werden, oder würde dies mehr belasten als nützen?

Forensik und Verbrechen

Mit jeder Technologie, die man zur Bekämpfung von Verbrechen einsetzen kann, kann auch Missbrauch getrieben werden. Wie bereits in Kapitel 24 erwähnt, ist die Forensische Molekularbiologie – die Verwendung von DNA zur persönlichen Identifizierung bei Kriminalfällen und zivilrechtlichen Fällen – heute weitgehend akzeptiert (Abb. 25.8). Nach Ausräumung der anfänglichen technischen Probleme kann man heute mittels einer ordnungsgemäß durchgeführten DNA-Analyse mit überwältigender Wahrscheinlichkeit Menschen zuverlässig persönlich identifizieren. Zu den bedeutsamsten Ergebnissen solcher Analysen zählt, dass aufgrund von DNA-Beweisen eine beträchtliche Zahl von Verdächtigen, die aufgrund weniger verlässlicher Identifizierungsmethoden fälschlicherweise verurteilt worden waren, freigelassen werden konnten.

Die noch nicht gelösten ethischen Fragen beziehen sich unter anderem auf die Einrichtung nationaler oder internationaler Datenbanken, die DNA-Analysen von Kriminellen enthalten. Wer sollte darin aufgenommen werden? Wer sollte darauf zugreifen können? Im Augenblick werden zur Identifizierung nur DNA-Sequenzen verwendet, die in den Bereichen nichtcodierender DNA liegen. Irgendwann wird es jedoch möglich sein, auch das körperliche Erscheinungsbild und die mentalen Eigenschaften einer Person von ihrer DNA abzuleiten. Wird man an einem Tatort gefundene DNA-Spuren irgendwann, wenn dies möglich ist, weiter analysieren, um Informationen über mögliche Verdächtige zu erhalten?



25.8 Die Akzeptanz von DNA-Beweisen in der heutigen Gesellschaft

Diese Karte der USA zeigt die Zahl der Fälle, die mithilfe des CODIS-Systems für DNA-Beweise des FBI gelöst werden konnten. Insgesamt waren dies bis Dezember 2006 43 156 Fälle in 49 Bundesstaaten und zwei staatlichen Einrichtungen.

Zur Lösung von Kriminalfällen sind DNA-Beweise heute weithin akzeptiert. Die Einrichtung von Datenbanken mit DNA-Informationen von Kriminellen ist wegen der damit einhergehenden Verletzung der Privatsphäre nach wie vor etwas umstritten.

Konflikt von Wissenschaft und Religion

Schon immer in der Geschichte ist es zu Konflikten zwischen kirchlichen und politischen Einrichtungen sowie der modernen Wissenschaft gekommen. Vor allem die Fortschritte der modernen Biologie stehen häufig im Widerspruch zu traditionellen Moralvor-

stellungen. Die Gentechnik hat in den letzten Jahren sehr viel Aufmerksamkeit erregt, nur wenige der von ihr aufgeworfenen ethischen Fragen sind jedoch wirklich neu oder auf dieses Gebiet beschränkt. Ein Beispiel ist die bakteriologische Kriegsführung. Der Einsatz genetisch modifizierter Viren als Biowaffen ist für manche eine entsetzlich unmoralische Vorstellung. Ist es wirklich unmoralischer (oder weniger unmoralisch), wenn ein Biologe ein tödliches Virus entwickelt, als wenn ein Physiker eine Rakete mit Nuklearsprengkopf entwirft? Und wie steht es mit dem Höhlenmenschen, der eine bessere Axt erfand, um damit Konkurrenten zu töten?

Themen wie Bioterrorismus, der Widerstreit von Evolution und Kreationismus, Abtreibung und das Klonen von Menschen sind den meisten Lesern heute zwar vertraut, man sollte die Auseinanderset-

zung zwischen der Biologie und der Kirche jedoch unbedingt auch vor einem historischen Hintergrund betrachten. Schon lange bevor Charles Darwin sein Werk *Die Entstehung der Arten* schrieb, waren Religion und Biologie schon in einen Machtkampf verstrickt – in den Konflikt zwischen traditionellem religiösem Glauben und der weltlichen Medizin. Sowohl nach christlicher Tradition als auch nach der anderer Religionen galten Leben und Gesundheit als gottgegeben. Folglich beanspruchten die etablierten Religionen in vielen Gesellschaften die Kontrolle über Geburt, Fortpflanzung, Heilung und Tod für sich. Dies hat nicht selten zu einem Widerstand gegen weltliche Eingriffe in die Gesundheitsfürsorge geführt. Als beispielsweise die ersten Impfungen entwickelt wurden, verurteilte die christliche Kirche, insbesondere der Papst, diese als unzulässige Einmischung in den Willen Gottes. Epidemien von Infektionskrankheiten wie Pest oder Pocken wurden als Gottesurteil gegen sündige Menschen angesehen. Wenn Gott wollte, dass man lebt, dann würde man die Epidemie überstehen, wollte Gott, dass man stirbt, dann ließe es auf Gotteslästerung hinaus, sich impfen zu lassen.

Aus dieser Sicht könnte man Probleme wie Abtreibung oder das Klonen von Menschen ganz einfach als heutige Episoden des schon lange anhaltenden Machtkampfs zwischen der religiösen und der weltlichen Kontrolle über das menschliche Leben betrachten. Eigentlich steht die moderne Biologie genauso mit fast allen neuen religiösen Kulturen und der New-Age-Ideologie in Widerspruch. Die Molekularbiologie wirkt sich auf diese Gebiete in erster Linie dadurch aus, dass sie unserem Bild von der Evolution neue Details hinzufügt. Der grundlegende ideologische Dissens bleibt genauso bestehen wie zuvor und sprengt den Rahmen dieses Buches.

Fragen:

War an der Entstehung des Lebens oder des Universums etwas Übernatürliches beteiligt?

Wenn Gott die Welt erschaffen hat, was bedeutet dies dann für die Gentechnik und andere Eingriffe des Menschen in die Natur?

Ist die Evolution mit dem religiösen Glauben vereinbar?

Wenn es keinen Gott gibt, woher kommt dann die Moral? Ist beispielsweise die Ethik der Evolution, beruhend auf Konkurrenz und dem Kampf ums Überleben, die einzige Grundlage für die Beurteilung von Verhalten?

Sollte man Forschungen auf Gebieten, die mit dem religiösen Glauben in Konflikt stehen, unterbinden?

Hat sich auch auf anderen Planeten des Universums Leben entwickelt, und wenn ja, was bedeutet dies?

Sind wir allein im Universum? Haben wir die moralische Verpflichtung, es mit irdischen Lebensformen zu besiedeln?

Sollten wir mithilfe der Gentechnik Lebensformen schaffen, die Planeten besiedeln können, auf denen irdisches Leben in seiner jetzigen Form nicht überleben könnte?

Wissenschaft und Religion sind häufig in Konflikt geraten. Die Gentechnik hat eigentlich keinen Einfluss auf den grundlegenden Dissens.

Konflikt mit egalitären Ideologien

Genau wie die moderne Biologie zu religiösen Vorstellungen im Widerspruch steht, so gerät sie auch mit den meisten weltlichen Ideologien in Konflikt. Ganze Kategorien weltlicher Ideologien beruhen auf der Vorstellung der Gleichheit. Menschen sind aber nicht gleich; sie unterscheiden sich erheblich in ihren Fähigkeiten, und viele davon sind teilweise oder sogar größtenteils erblich. Sowohl der sowjetische Kommunismus als auch der amerikanische Liberalismus versuchen, das Problem der unterschiedlichen menschlichen Fähigkeiten, insbesondere zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen, mit Einflüssen durch die Umwelt zu erklären. Ähnliche Aussagen werden zu den Unterschieden im Verhalten von Männern und Frauen getroffen. Genau wie die christliche Kirche versucht hat, prekäre Gebiete der Wissenschaft zu zensieren, haben extrem linksgerichtete Ideologien versucht, die Forschung sowie freie Diskussionen auf Gebieten wie der Vererbung des IQ oder der Wirkung von Hormonen auf die Festlegung der „Geschlechterrolle“ zu unterdrücken. Für ziemlich lange Zeit erlaubte die Sowjetunion nur getreuen Parteimitgliedern Zugang zur „kapitalistischen Genetik“, der Allgemeinbevölkerung war dieses Gebiet verboten. Heute werden nach und nach Gene identifiziert, die am Verhalten und an der Funktion des Gehirns beteiligt sind. Es kommen immer mehr molekulare Details ihrer Mechanismen und Funktionsweisen ans Licht. Diese Erkenntnisse untergraben zunehmend das gesamte Konzept von der Gleichheit der Menschen.

Ein interessantes Beispiel ist die Homosexualität. Vor rund 20 Jahren wurde die Andeutung, Homo-

sexualität sei auf einen Gendefekt zurückzuführen, als „politisch äußerst inkorrekt“ dargestellt, und die amerikanischen Liberalen hätten dies als „Homophobie“ verurteilt. Heute behaupten einige Schwulenorganisationen selbst, dass Homosexualität eine genetische Grundlage habe. Bislang gibt es weder für die eine noch die andere Seite einen überzeugenden Beweis, aber eigentlich kann man sich kaum vorstellen, dass die Genetik nicht daran beteiligt ist.

Fragen:

Das gesamte Szenario der „Sozialkonstruktion“ (Fördermaßnahmen zugunsten Benachteiligter, Quoten etc.), das in vielen westlichen Gesellschaften in den vergangenen fünf Jahrzehnten vorgeherrscht hat, beruht auf der folgenden Behauptung: Unterschiede in den Fähigkeiten oder im Verhalten zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen sind auf Umwelteinflüsse und „Diskriminierung“ zurückzuführen. Was wäre, wenn sie überwiegend genetisch bedingt wären?

Sollte man Forschungen auf Gebieten, die mit der politischen Korrektheit in Konflikt geraten, unterbinden oder zensurieren? Sollte man „sensible Informationen“ auf Leute beschränken, denen man aufgrund ihrer politischen Loyalität vertrauen kann?

Sollte man versuchen, Verhaltensstörungen oder -neigungen zu heilen, wenn diese eine biologische Grundlage haben?

Welche Auswirkungen hätte es, wenn man eine genetische Prädisposition für Gewaltverbrechen bei den Betroffenen bereits im Kindesalter feststellen könnte? Sollten potenzielle Mörder und Sexualverbrecher als Vorsichtsmaßnahme gleich eingesperrt werden, bevor sie irgendwelche Verbrechen begehen?

Werden Analysen der fetalen DNA Vorhersagen über den potenziellen zukünftigen IQ eines Kindes ermöglichen? Und wenn ja, werden sich Eltern dann bei Feten mit niedrigem IQ für einen Schwangerschaftsabbruch entscheiden? Werden Männer mit hohem IQ Samen für künstliche Befruchtungen zur Verfügung stellen (oder verkaufen)?

Die Wissenschaft und nichtreligiöse Ideologien stehen ebenfalls in Konflikt. Die moderne Genetik untergräbt ständig viele moderne Ideologien.

Besitz genetischer Informationen

Wem erworbenes Wissen gehört, ist schon eine alte Frage. In den westlichen Industrienationen gilt im Allgemeinen die Regel: Wenn man etwas erfindet,

darf man es patentieren lassen und kann davon profitieren. Aber wie weit gehen diese Rechte? Erfindet man eine Kamera, so ist klar, dass man die Rechte an dieser Kamera besitzt. Aber wenn man mit dieser Kamera ein Foto des Mondes macht? Gehört einem dann der Mond oder nur das Foto? Das klingt so natürlich ziemlich absurd. Wenn man jedoch einen Sequenzierautomaten erfindet und damit ein Gen sequenziert (beispielsweise von einem anderen Menschen), gehört einem dann die Sequenzinformation? Sollte man bereits vorhandene Informationen, die durch neue Technologien ans Licht gebracht wurden, patentieren können, oder sollten Patente auf neue Methoden, Geräte oder Techniken beschränkt sein?

Genetisch modifizierte Bakterien und andere transgene Organismen wurden bereits in beträchtlicher Zahl patentiert. Vermutlich gelten sie als neue Erfindungen. Die Frage bezüglich des Besitzes von DNA-Sequenzen ist nach wie vor umstritten, verschiedene Länder haben hierzu unterschiedliche Standpunkte. In der Praxis bringen der Verkauf von Medikamenten und Diagnose-Kits das Geld ein. Welchen finanziellen Wert eine DNA-Sequenz hat, ist fraglich.

Sollten Wissenschaftler, deren Arbeit an Universitäten durch öffentliche Gelder finanziert wird, ihre Entdeckungen patentieren lassen und persönlich davon profitieren können? An den meisten Universitäten ist festgelegt, dass die Profite aufgeteilt werden, beispielsweise 50:50 zwischen dem Forscher und der Institution. Einer anderen Auffassung zufolge sollte sämtliches Wissen, das durch vom Steuerzahler finanzierte Forschungen erworben wurde, öffentliches Eigentum sein – zumindest sollten sämtliche Informationen allen Menschen frei zugänglich gemacht werden. Diese Einstellung mag vielleicht zu idealistisch klingen. Informationen sicher zu verwahren ist in der Praxis weitaus schwieriger, als materiellen Besitz zu hüten. Typische Beispiele sind Raubkopien von DVDs und Musik-CDs oder der Download von MP3-Dateien über das Internet.

Fragen:

Wenn man von einem Unternehmen oder vom Steuerzahler dafür bezahlt wird, dass man eine neue Technologie entwickelt, wer hat dann das Besitzrecht an der Technologie: man selbst, das Unternehmen oder die Öffentlichkeit? Was ist, wenn es sich bei der „Entwicklung“ um eine Idee handelt – wem gehört sie dann?

Würden Sie eine Einverständniserklärung unterzeichnen, die einer Firma die alleinigen Rechte an sämtlichen Ideen, Prozessen oder Erfindungen einräumt, die Sie entwickeln?

Wem gehören genetische Informationen? Dem Forscher? Demjenigen, der die Forschung finanziert hat? Demjenigen, von dessen Genom die Daten stammen? Der Öffentlichkeit?

Biologische Probleme auf lange Sicht

Viele der zuvor erwähnten bioethischen Probleme sind aufgrund der technologischen Neuerungen gerade aktuell, werden aber wahrscheinlich schon relativ bald wieder aus dem öffentlichen Interesse verschwinden. Übrig bleiben werden überwiegend grundlegende Probleme, die sowohl für Neuerungen als auch für ältere Technologien gelten, etwa der Zugang zur Gesundheitsfürsorge oder die Verletzung der Privatsphäre. Es gibt jedoch noch einige biologische Probleme, die weniger romantisch, dafür aber von wirklicher Bedeutung sind. Daher sollen sie als Gegengewicht zu Themen wie dem Klonen von Menschen zumindest kurz erwähnt werden.

Durch die Fortschritte in der medizinischen Technologie in den letzten beiden Jahrhunderten hat sich die Lebenserwartung in den Industrienationen von Mitte dreißig auf Mitte siebzig erhöht. Die Kindersterblichkeit ist von annähernd 50 % auf weniger als 1 % gesunken. Die daraus folgende Bevölkerungsexplosion ist für unseren Planeten weitaus bedrohlicher als jegliche hochtechnisierte Manipulation an der Natur. Maßnahmen gegen die Umweltverschmutzung und zur Wiederverwertung könnten zwar etwas Abhilfe schaffen, durch den Anstieg der menschlichen Bevölkerung werden aber unweigerlich mehr Ressourcen verbraucht, und die Natur wird im Übermaß in Anspruch genommen.

Eine weitere Folge der gestiegenen Lebenserwartung ist, dass das Durchschnittsalter der menschlichen Bevölkerung zunimmt. Der immer größer werdende Anteil alter und pensionierter Menschen stellt für das Gesundheitswesen der fortschrittlichen Nationen eine gewaltige Belastung dar. Immer häufiger hört man Warnungen vor dem bevorstehenden Kollaps des Gesundheitssystems. Verschärft werden diese Trends durch die hohen Kosten vieler neuer medizinischer Technologien. In den Vereinigten Staaten fließen beispielsweise etwa 20 % der Ausgaben in die allgemeine Gesundheitsfürsorge, wäh-

rend eine unverhältnismäßig große Summe dafür aufgewendet wird, alte Menschen in ihren letzten Lebensmonaten am Leben zu erhalten. Ein weiterer Faktor ist Fettleibigkeit. Immer mehr Bewohner von Industrienationen werden immer dicker. Das zieht starke gesundheitliche Folgeschäden nach sich, von denen viele, beispielsweise Diabetes, eine teure Langzeitbehandlung erfordern.

Durch das Bevölkerungswachstum leben die Menschen in immer höherer Dichte, durch das moderne Verkehrswesen hat sich die Mobilität erhöht. In Kombination haben diese beiden Faktoren zu einer raschen Ausbreitung von Infektionskrankheiten auf der ganzen Welt geführt. Von großen Pandemien wie Aids und Tuberkulose bis zu weniger stark verbreiteten Epidemien wie Cholera und West-Nil-Virus gibt es verhängnisvolle Anzeichen dafür, dass Infektionskrankheiten wieder im Kommen sind. Gleichzeitig erleben wir eine Ausbreitung genetischer Resistenzen: von Bakterien gegen Antibiotika, von Viren gegen antivirale Wirkstoffe und unter Insekten, die Infektionskrankheiten übertragen oder Ernten vernichten, gegen Insektizide. Einerseits wird es immer kostspieliger, sich gegen neue oder resistente Infektionserreger in den reichen Nationen zur Wehr zu setzen, andererseits wirkt die Ausbreitung tödlicher Infektionskrankheiten in den ärmeren Ländern in gewissem Umfang der Bevölkerungsexplosion entgegen. Besonders augenfällig ist dies in Afrika, wo derzeit – vor allem aufgrund von Aids – ein Bevölkerungsrückgang prognostiziert wird.

Eine solche Aufzählung von Problemen erzeugt zumeist eine düstere Stimmung. Daher wollen wir mit der Aussage schließen, dass die meisten heutigen Probleme eigentlich durch Erfolge entstanden sind. Verantwortlich für die heutige Überbevölkerung ist die westliche Wissenschaft – eben weil sie die Probleme der Vergangenheit in Form von Hunger und Krankheiten gelöst hat. Unserer Ansicht nach werden sich durch entsprechende Technologien auch viele der Probleme neuerer Generation lösen lassen. Die thematisierten Probleme sollten daher eher als Liste zu erledigender Aufgaben betrachtet werden, denn als potenzielles Untergangsszenario.

Viele der heutigen Probleme sind erst durch Erfolge in der Vergangenheit entstanden. Durch die höhere Lebenserwartung und den höheren Lebensstandard der Menschen werden zwangsläufig mehr Ressourcen benötigt.

► Weiterführende Literatur

- Adcock M (2007) Intellectual property, genetically modified crops and bioethics. *Biotechnol J* 2: 1088–1092
- Baoutina A, Alexander IE, Rasko JE, Emslie KR (2007) Potential use of gene transfer in athletic performance enhancement. *Mol Ther* 15: 1751–1766
- Birnbacher D (2005) Human cloning and human dignity. *Reprod Biomed Online* 10 (Suppl. 1): 50–55
- Caulfield T, Cook-Deegan RM, Kieff FS, Walsh JP (2006) Evidence and anecdotes: An analysis of human gene patenting controversies. *Nat Biotechnol* 24: 1091–1094
- Devolder K (2006) What's in a name? Embryos, entities, and ANtities in the stem cell debate. *J Med Ethics* 32: 43–48
- Fiester A (2005) Ethical issues in animal cloning. *Perspect Biol Med* 48: 328–343
- Fischbach GD, Fischbach RL (2004) Stem cells: Science, policy, and ethics. *J Clin Invest* 114: 1364–1370
- French AJ, Wood SH, Trounson AO (2006) Human therapeutic cloning (NTSC): Applying research from mammalian reproductive cloning. *Stem Cell Rev* 2: 265–276
- Melo EO, Canavessi AM, Franco MM, Rumpf R (2007) Animal transgenesis: State of the art and applications. *J Appl Genet* 48: 47–61
- Murray TH (2005) Ethical (and political) issues in research with human stem cells. *Novartis Found Symp* 265: 188–211
- Roche PA, Annas GJ (2006) DNA testing, banking, and genetic privacy. *N Engl J Med* 355: 545–546
- Strong C (2005) Reproductive cloning combined with genetic modification. *J Med Ethics* 31: 654–658
- Taymor KS, Scott CT, Greely HT (2006) The paths around stem cell intellectual property. *Nat Biotechnol* 24: 411–413
- Thomas SM (2004) Society and ethics – the genetics of disease. *Curr Opin Genet Dev* 14: 287–291
- Unal M, Ozer Unal D (2004) Gene doping in sports. *Sports Med* 34: 357–362
- Wolpert L (2007) The public's belief about biology. *Biochem Soc Trans* 35: 37–40
- Yoshimura Y (2006) Bioethical aspects of regenerative and reproductive medicine. *Hum Cell* 19: 83–86

Glossar

G

AB0-Blutgruppen Set von Blutantigenen auf der Oberfläche roter Blutkörperchen, bestehend aus drei verschiedenen (aber verwandten) Glykolipiden

abgeschwächter (attenuierter) Impfstoff Ein lebendes Pathogen, das keine Krankheit mehr auslöst, aber dennoch das Immunsystem zur Antikörperbildung stimuliert

ρ -abhängiger Terminator Terminator der Transkription, der auf das ρ -Protein angewiesen ist

Acetylserin-Sulphydrylase Enzym, das O-Acetylserin mithilfe von Hydrogensulfid in Cystein umwandelt

Achondroplasie Erblicher Defekt, verursacht durch eine Mutation des *FGFR3*-Gens, das für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR) Nr. 3 codiert. Auch bekannt als chondrodystropher Zwergwuchs.

Ada-Gen Gen, das für das Enzym Adenosin-Desaminase codiert

addiction module Genset, das den Zelltod bei Bakterien kontrolliert (z.B. bei *E. coli*)

Adeno-assoziierte Viren (AAV) Defekte Viren oder „Satellitenviren“, die auf ein Adenovirus (oder einige Herpesviren) angewiesen sind, das einige wesentliche Funktionen bereitstellt

Adenosin-Desaminase Enzym, das am Stoffwechsel der Purinbasen beteiligt ist. Seine Abwesenheit verhindert die Entwicklung von B- und T-Zellen.

Adenoviren Familie kleiner, kugelförmiger Viren mit doppelsträngiger DNA, die Tiere infizieren

Adenovirus-36 Adenovirusstamm, der Fettleibigkeit verursacht

Adenylat-Cyclase Enzym, das cAMP synthetisiert

Adhärente Zelllinien Zellen in Kultur, die an Kulturschalen haften und wachsen

Adhäsi Bakterielle Proteine, die an Glykoproteine oder Glykolipide an der Oberfläche tierischer Zellen binden

Adjuvans (oder Carrier) Stoff, der die Wirkung eines Impfstoffs unterstützt

ADP-Ribose Molekulares Fragment, das aus Adenosindiphosphat plus Ribose besteht. Es entsteht normalerweise durch Spaltung von NAD.

ADP-Ribosylierung Addition einer ADP-Ribose-Gruppe an ein Protein, welches daraufhin seine Aktivität verändert oder komplett einstellt

Aedes aegypti Stechmückenspezies, Überträger des Gelbfiebers

β 3-adrenerger Rezeptor Rezeptor auf der Oberfläche von Fettzellen, der Noradrenalin (Norepinephrin) bindet

Aequorin Ein Protein aus der Leuchtqualle *Aequorea victoria*, das – ausgelöst durch Calciumionen – blaues Licht emittiert

a-Faktor Kreuzungsfaktor der Hefe, der als Pheromon wirkt und Hefezellen des anderen Kreuzungstyps anzieht

Affinitätschromatographie Chromatographietechnik, bei der die stationäre Phase eine Bindungsstelle für ein spezielles Molekül (z.B. einen Antikörper) besitzt

A-Form Eine alternative Form der Doppelhelix, mit 11 bp pro Windung. Kommt häufig bei doppelsträngiger RNA vor, aber selten bei DNA.

Agarose Ein Polysaccharid aus Meeresalgen, das zur Herstellung von Gelen verwendet wird, um Nucleinsäuren durch Elektrophorese zu trennen

aggressive Gentherapie Therapie gegen Krebs oder Infektionen, bei der Gene oder Genprodukte eingeschleust werden, die Krebszellen oder infektiöse Agenzien abtöten

Aguti Graubraune Fellfarbe von Mäusen infolge eines dominanten Allels

Ähnlichkeitssuche Vergleich neuer DNA-Sequenzen mit bekannten Sequenzen, um ihre Identität festzustellen

Aids (erworbenes Immunschwächesyndrom) Eine Krankheit, ausgelöst durch das Retrovirus HIV, die langsam das Immunsystem unterminiert, indem sie die T-Zellen zerstört

Aktivatorprotein Protein, das ein Gen anschaltet

- Akzeptorarm** Arm der tRNA, an den die Aminosäure angeheftet wird
- Alkalische Phosphatase** Enzym, das von verschiedenen Substraten Phosphatgruppen abspaltet
- Allel** Spezielle Version eines Gens bzw. eine spezielle Version eines jeden Locus auf einem DNA-Molekül
- allgemeine Transkriptionsfaktoren** Proteine, die die Expression aller Gene steigern oder unterdrücken
- allgemeines Sekretionssystem (Sec-System)** Standardsystem, um Proteine durch Membranen zu exportieren. Es findet sich bei den meisten Organismen.
- alternative splicing library** Bibliothek aus DNA- oder Protein-Sequenzabschnitten, die durch zufällig aufgenommene oder ausgeschlossene Exons des Originalproteins entstanden ist
- Alu-Sequenz** Ein Beispiel eines SINE, eine bestimmte kurze DNA-Sequenz, die in hoher Kopienzahl auf den Chromosomen von Menschen und Primaten vorkommt
- Amantadin** Antiviraler Wirkstoff, der Ionenkanäle blockiert und sich in der Außenhülle des Influenza-A-Virus findet
- Aminoacyl-tRNA-Synthetase** Enzym, das eine Aminosäure an die tRNA anheftet
- Aminopeptidase** Protease, die Aminosäuren vom aminoterminalen Ende einer Polypeptidkette abspaltet
- Amme** (in der Genetik) Weibliches Tier, das gentechnisch modifizierte Embryonen trägt
- Amniocentese** Eine Methode, um Fruchtwasser mit darin enthaltenen fetalen Zellen zu untersuchen
- Amyloid-Aggregate** Unlösliche Klumpen falsch gefalteter Proteine, die bei verschiedenen Krankheiten vorkommen, wie der Alzheimer-Krankheit und Prion-Krankheiten
- Amyloid- β** Ein Peptidfragment eines Proteins, dass in neuritischen Plaques vorkommt
- Amylopektin** Verzweigte Komponente der Stärke
- Amylose** Lineare Komponente der Stärke
- Analyt** Gemisch aus Molekülen (z.B. Proteinen), das chromatographisch untersucht wird
- Angelman-Syndrom** Erblicher Defekt, der durch einen Funktionsverlust von Genen auf dem mütterlichen Chromosom 15 hervorgerufen wird, die der genetischen Prägung unterliegen
- Angiogenese** Entwicklung neuer Blutgefäße
- Anopheles gambiae** Stechmückenspezies, die Malaria überträgt
- Anthrax** Infektionskrankheit bei Rindern, mit der sich auch Menschen leicht infizieren. Sie wird durch das Bakterium *Bacillus anthracis* hervorgerufen.
- Anticodon** Gruppe von drei komplementären Basen auf der tRNA, die ein Codon auf der mRNA erkennen und binden
- anti-Gen** Gen, das durch Transkription eine vollständige Antisense-RNA ergibt
- Antigen Capture Immunoassay** Protein-Detektionsmethode, bei der ein Antikörper an eine feste Oberfläche gebundenen ist und ein spezielles Protein aus einem Gemisch isoliert wird
- Antigene** Moleküle, die eine Immunantwort auslösen. Sie werden von Antikörpern erkannt und gebunden.
- Antikörper** Proteine des Immunsystems, die fremde Moleküle (Antigene) erkennen und binden
- Antionkogene** Gene, die unerwünschte Zellteilungen verhindern (das gleiche wie Tumorsuppressorgene)
- antiparallel** Parallel, aber in unterschiedliche Richtungen verlaufend
- antisense (nichtcodierend)** Der DNA-Strang, der komplementär zur mRNA ist
- Antisense-DNA** Einzelsträngige DNA, mit einer Sequenz, die komplementär zu einem speziellen DNA- oder RNA-Zielmolekül ist (in der Regel mRNA); die Bindung einer Antisense-DNA an eine mRNA kann die Translation blockieren.
- Antisense-DNA-Oligonucleotid** Kurze Antisense-DNA
- Antisense-RNA** RNA mit einer zur mRNA komplementären Sequenz, deshalb binden beide aneinander
- Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz** Sequenz auf der 16S-rRNA, die komplementär zu der Shine-Dalgarno-Sequenz der mRNA ist
- Antiterminatorproteine** Proteine, die das Überlesen einer Terminationsstelle der Transkription ermöglichen
- AP-1 (Aktivatorprotein-1)** Eukaryotischer Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl von Genen aktiviert
- Apoptose** Genetisches Programm, das geschädigte Zellen oder solche, die nicht mehr benötigt werden, eliminiert. Das Immunsystem wird dabei nicht aktiviert.
- Apoptosekörper** Kompakte Granula einer apoptotischen Zelle
- Apoptosom** Ein Komplex aus Signalproteinen, der während der Apoptose die Caspase-3 bei Säugtieren aktiviert
- Aptamer** Oligonucleotid, das an ein anderes Molekül bindet, meist ein Protein. Es wird nicht von einer natürlich vorkommenden DNA-Sequenz codiert.

Ascosporen Sporentyp, der von Pilzen aus der Gruppe der Ascomyceten (z.B. Hefe und Schimmelpilze) innerhalb eines Ascus gebildet wird

Ascus Spezielle Struktur bei Ascomyceten, in der die Sporen entstehen

Aspartatprotease Eine Klasse von Proteasen, mit zwei Aspartatresten im aktiven Zentrum

Assembler Eine Maschine, die im Nanomaßstab Strukturen herstellen kann, indem sie durch Positionierung von Molekülen chemische Reaktionen steuert

ATP-Synthetase Enzym, das mithilfe von Energie aus der Atmungskette ATP synthetisiert

Auflösung Die Schärfe eines Peaks nach der Auftrennung von Molekülen im Rahmen einer Chromatographie

Aufspaltungsregel Allele eines Gens werden bei der Gametenbildung auf verschiedene Gameten verteilt – und bei der Befruchtung wieder vereint.

Ausschlusschromatographie Chromatographie-Technik, die eine Trennung anhand der Größe ermöglicht

autogene Regulation Selbstregulation; ein DNA-bindendes Protein reguliert die Expression seines eigenen Gens.

Autoradiographie Erlaubt ein sichtbares Bild von radioaktivem Material zu erstellen, indem es flach auf einen Röntgenfilm gelegt wird.

Avidin Ein Protein aus Hühnereiern, das fest an Biotin bindet

Azidothymidin (AZT) Nucleosidanalogon, das als Kettenterminator fungiert. Es wird gegen Aids eingesetzt und ist auch als Zidovudin bekannt.

Bacillus anthracis Bakterium, das Milzbrand (Anthrax) auslöst und leicht Menschen infiziert

Bacmid Hybrid-Klonierungsvektor, wird aus einem Baculovirus und einem Plasmid hergestellt.

Bacteriocin Toxisches Protein, das von Bakterien hergestellt wird, um nahe verwandte Bakterien zu töten

Baculoviren Familie von DNA-Viren, die Insekten und verwandte Wirbellose infizieren. Sie werden verbreitet als Vektoren benutzt.

Bakterienrasen Uniformes Bakterienwachstum, das die gesamte Oberfläche des Wachstumsmediums bedeckt. Einzelne Bakterienkolonien sind nicht sichtbar.

Bakteriophage Virus, das Bakterien infiziert

Bakteriophagenvektor Bakteriophagen genom, in dem nicht-essenzielle Gene durch eine multiple Klonierungsstelle ersetzt wurden. In diese können DNA-Fragmente kloniert werden. Der Vektor

kann in einer Bakterienzelle erhalten werden, da er alle nötigen Gene für Replikation, Wachstum und Lyse besitzt.

Barcodesequenz Einzigartige Sequenz mit einer Länge von 20 Nucleotiden, die jedem Klon einer Bibliothek hinzugefügt wird. Auf diese Weise können die Klone identifiziert werden.

Base Alkalische chemische Substanz. Speziell in der Molekularbiologie sind damit die zyklischen, stickstoffhaltigen Verbindungen in der DNA und RNA gemeint.

Basenaustausch Mutation, bei der eine Base durch eine andere ersetzt wird

59-Basen-Element (59-be) (s. *attC*-Stelle) Eine sich wiederholende Sequenz, die einen stark konservierten Kern aus sieben Nucleotiden enthält und eine Genkassette flankiert

basische Peptide Kurze Reihe basischer Aminosäuren, die Translokationen durch biologische Membranen unterstützen. Sie werden von bekannten Proteinen abgeleitet oder synthetisiert.

Basispeak Peak des intensivsten Ions in einer Probe

Bcl-2 Mitochondriale Proteine, die mithelfen, den Eintritt in die Apoptose zu kontrollieren

Beulenpest Ansteckende bakterielle Erkrankung, die von Flöhen verbreitet wird. Kommt hauptsächlich bei Nagetieren vor.

Beuteprotein Fusion zwischen der Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsaktivators und einem weiteren Protein im Rahmen der Two-Hybrid-Analyse

B-Form Normale Form der DNA-Doppelhelix, ursprünglich beschrieben von Watson und Crick

Bioaugmentation Ausbringen spezieller Mikroorganismen (natürliche und künstlich hergestellte) plus ihrer Energiequelle, um eine Umwelt von einem Schadstoff zu befreien

Bioinformatik Computergestützte Analyse großer Mengen biologischer Sequenzdaten

Biologische Schutzstufe Es existieren vier Kategorien, um Hochsicherheitslaboratorien zu klassifizieren.

Biopanning Methode, um in einer Phagen-Display-Bibliothek nach einem bestimmten Protein zu screenen, indem es an ein „Köder“-Molekül bindet, das an einen festen Träger gebunden ist

Bioreaktoren Große Kammern, in denen Organismen wie Bakterien oder Hefe kultiviert werden. Ziel ist die Gewinnung biotechnologischer Produkte im großen Maßstab.

Bioremediation Mithilfe von Mikroorganismen, Pilzen, Pflanzen oder Enzymen wird die Umwelt

gereinigt oder in ihren ursprünglichen Zustand zurückversetzt.

Biosensor Detektions- oder Monitoringelement, das sich auf einen biologischen Mechanismus stützt

biosensorisches System Ein genetischer Schaltkreis, der von einem spezifischen Auslösereiz kontrolliert wird

Biostimulation Ausbringen von chemischen Verbindungen in die Umwelt, um natürlich vorkommende Mikroorganismen zum Abbau eines Schadstoffs anzuregen

Blastocyste Ein sehr frühes Embryonalstadium

Blutantigene Glykoproteine und Glykolipide auf der Oberfläche von Blutzellen; werden zur Blutgruppenanalyse herangezogen.

Blutgruppenbestimmung Unterschiede bei den Blutantigenen werden genutzt, um die Identität zu bestimmen.

Bohr-Radius Der natürliche Abstand zwischen der positiven und negativen Ladung in einem Material

Botox Botulinustoxin; wird unter anderem in der Kosmetik eingesetzt.

Botulinustoxin Proteintoxin, das von *Clostridium botulinum* produziert wird. Es blockiert die Übertragung von Signalen von den Nerven zu den Muskeln.

Botulinustoxin Typ A Eine spezielle Variante des Botulinustoxins, die zu klinischen und kosmetischen Zwecken eingesetzt wird

Bovine Spongiforme Encephalopathie (BSE) Offizielle Bezeichnung des Rinderwahnsinns, einer degenerativen Erkrankung des Gehirns bei Rindern, verursacht von Prionen

BRCA1-Gen Brustkrebsgen A1, ist an der DNA-Reparatur beteiligt. Defekte in diesem Gen prädisponieren Frauen für Brustkrebs.

BRCA2-Gen Brustkrebsgen A2, ist an der DNA-Reparatur beteiligt. Defekte in diesem Gen prädisponieren Frauen für Brustkrebs.

Brechungsindexdetektor Ein Gerät, das Änderungen in der Geschwindigkeit des Lichts beim Durchdringen einer Flüssigkeit (z.B. das Eluat einer Säule) misst

5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) Ein Nucleotidanalogen für Thymin, das während der Replikation leicht in die DNA eingebaut wird

Bt-Toxin Toxin, das sich im Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* findet. Es tötet einige Raupen, die Feldfrüchte zerstören.

B-Zelle Zelle des Immunsystems, die Antikörper produziert

bZIP-Proteine Familie von Transkriptionsfaktoren mit einer Leucin-Zipper-Domäne

CAD (Caspase-aktivierte DNase) Eine Nuclease, die Kern-DNA zwischen den Nucleosomen spaltet; wird im Rahmen der Apoptose von Caspasen aktiviert.

Calmodulin Ein kleines, Ca^{2+} -bindendes Protein in tierischen Zellen

CAP (Kataboliten-Aktivatorprotein) Transkriptions-Enhancer-Protein, das durch Bindung an cAMP die Transkription von Operons, die an der Zuckermetabolisierung beteiligt sind, aktiviert

Capsid Schützende Hülle, die die DNA oder RNA eines Viruspartikels umgibt

Cap-Struktur Struktur am 5'-Ende der eukaryotischen mRNA, bestehend aus einer methylierten Guaninbase, angeheftet in entgegengesetzter Orientierung

CAR (Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor) Rezeptor auf tierischen Zellen, den Adenoviren und Coxsackieviren der Gruppe B gemeinsam haben

Carboxypeptidase Enzym, das Aminosäuren vom C-terminalen Ende eines Proteins abspaltet

Carboxypeptidase H Spezielle Carboxypeptidase, die bei der Prozessierung des Insulins benötigt wird

Carrier (oder Adjuvans) Stoff, der die Wirkung eines Impfstoffs unterstützt

Caspase Enzym, das den Proteinabbau im Rahmen der Apoptose durchführt. Caspasen verdauen andere Proteine durch Spaltung nach Asparaginsäureresten.

Caspase-aktivierte DNase (CAD) Eine Nuclease, die Kern-DNA zwischen den Nucleosomen spaltet; wird im Rahmen der Apoptose von Caspasen aktiviert.

Catecholamine Familie von Neurotransmittern, zu der Dopamin, Adrenalin (Epinephrin) und Noradrenalin (Norepinephrin) gehören

Catenane Strukturen, in denen zwei oder mehr DNA-Ringe miteinander verbunden sind

CCR5 Ein Protein, das als Rezeptor für den Eintritt von HIV in die Wirtszelle fungiert. Seine natürliche Rolle ist die eines Chemokinrezeptors.

CD4-Protein Protein auf der Oberfläche vieler T-Zellen; es dient als Rezeptor für HIV.

CD-Antigene Zelloberflächenproteine, die sich auf Leukocyten finden. Sie werden benutzt, um die verschiedenen Typen von Leukocyten zu klassifizieren.

Cellulose Polymer aus β -1,4-glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten; kommt in den Zellwänden von Pflanzen vor.

Centromer Region auf eukaryotischen Chromosomen, an die sich die Mikrotubuli während der Mitose und Meiose anheften

Centromer-(Cen)Sequenz Sequenz an den Centromeren eukaryotischer Chromosomen, die für eine korrekte Verteilung der Chromosomen während der Zellteilung nötig ist

Cephalosporine Untergruppe der β -Lactam-Antibiotika

CFTR-Protein Protein, das von dem Gen für cystische Fibrose codiert wird. Es findet sich in Zellmembranen, wo es als Kanal für Chloridionen fungiert.

CG-Inseln Regionen auf der eukaryotischen DNA, die viele geclusterte CG-Sequenzen enthalten. Diese dienen als Ziele für die Cytosin-Methylierung.

Chaperonin Protein, das die korrekte Faltung anderer Proteine überwacht

Checkerboard-Hybridisierung Technik zum Massenscreening von DNA-Proben. Es werden Sonden gegen die 16S-rRNA-Gene eingesetzt, die einer Vielzahl von Bakterien entsprechen.

Chemokine Eine Gruppe von ungefähr 50 kleinen Botenpeptiden, die die weißen Blutkörperchen des Immunsystems aktivieren

Chemokinrezeptor Zelloberflächenprotein, das für die Aufnahme von Chemokinen in tierische Zellen benötigt wird

Chimären Tiere, in denen verschiedene Zellen genetisch variieren

ChIP-Chip Technik zur Identifizierung der Sequenz von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren durch genomweite Arrays, nachdem die Bindungsstellen mit einem Transkriptionsfaktor quervernetzt und durch Immunpräzipitation isoliert wurden

Chloroplasten-Transit-Peptid Kleines Peptid, das an den N-Terminus eines Proteins angefügt wird und das Protein vom Ribosom in den Chloroplasten dirigiert

Choleratoxin Toxisches Protein, das von *Vibrio cholerae* hergestellt wird und für eine dauerhafte Aktivierung der Adenylat-Cyclase in tierischen Zellen sorgt

Cholesterin Sterinderivat, das sich in Menschen und Tieren findet. Es hat einen bedeutenden Effekt auf die Atherosklerose.

Chorea Huntington Erblicher Defekt, der die Nervenzellen betrifft; die Folgen sind ein Kontrollverlust über die Gliedmaßen, geistige Störungen und Demenz.

Chromatin Ein Komplex aus DNA und Proteinen, aus dem eukaryotische Chromosomen bestehen

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) Immunpräzipitation von Transkriptionsfaktoren, quervernetzt mit ihren Bindungsstellen auf der DNA

Chromatographie Technik, die einen Mix aus Molekülen nach ihrer Größe oder chemischen Eigenschaften auftrennt

Chromatographie-Säule Eine lange Röhre, die die stationäre Phase für die Chromatographie enthält

chromosome walking Methode, um benachbarte Regionen auf dem Chromosom zu klonieren, indem man durch wiederholtes Hybridisieren überlappende Klone identifiziert

chronic wasting disease (CWD) Prion-Krankheit von Rotwild im Norden der USA

chronologisches Altern Zeitspanne, die eine Hefezelle leben kann, ohne sich zu teilen

Circumsporozoit-Protein Protein auf der Oberfläche des Malaria-Sporozoiten

Cistron DNA- oder RNA-Segment, das eine einzige Polypeptidkette codiert

ClfA Ein Protein, das sich auf der Oberfläche von *Staphylococcus aureus* befindet. Es ermöglicht den Bakterien, sich an das Fibrinogen der Wirtszelle zu heften.

Clostridium botulinum Bakterium, das das Botulintoxin produziert

codierender Strang (siehe auch Nichtmatrizenstrang oder Sense-Strang) Dieser DNA-Strang ist äquivalent zur mRNA (identisch mit Plusstrang).

Codon Gruppe von drei RNA- oder DNA-Basen, die für eine einzige Aminosäure codieren

codon bias (s. Codongebrauch)

Codongebrauch Manche Organismen verwenden für Aminosäuren mit mehreren Codons nur eine Auswahl der möglichen Codons, andere Organismen wiederum eine andere Gruppe von Codons. Dieses Phänomen kann die Expression fremder Proteine in der Gentechnologie behindern.

codon usage (s. Codongebrauch)

Co-Immunpräzipitation Methode, um Protein-Interaktionen zu identifizieren, indem man Antikörper gegen eines der Proteine verwendet

Colicin Bacteriocin von *Escherichia coli*, das nahe verwandte Bakterien abtötet

complementarity determining region (CDR) Kurzes Segment, das auf der Oberfläche der variablen Region eines Antikörpers Schleifen und so einen Teil der Antigenbindungsstelle ausbildet

c-onc Zelluläre Version eines Onkogens

Contig Lückenlose lineare Anordnung einer bekannten DNA-Sequenz, bestehend aus kleineren klonierten Fragmenten

- Contig-Karte** Eine Genomkarte, basierend auf Contigs
- controlled pore glass (CPG)** Glas mit kontrollierter Porosität, das als solide Auflage für chemische Reaktionen dient, wie beispielsweise für die künstliche DNA-Synthese
- Coomassie-Blau** Ein blauer Farbstoff, der verwendet wird, um Proteine zu färben
- Core-Enzym** Teil der DNA- oder RNA-Polymerase, der die neue DNA oder RNA synthetisiert, d.h. ohne die Erkennungs- und/oder Bindungsuntereinheiten
- Corepressor** In Prokaryoten – ein kleines Signalmolekül, das manche Repressorproteine benötigen, um an DNA zu binden; in Eukaryoten – ein Hilfsprotein, oft eine Histon-Deacetylase, das bei der Reprimierung von Genen eine Rolle spielt
- Corezeptor** Protein, das zusätzlich zu dem Hauptrezeptor für das Eindringen eines Virus in eine Wirtszelle benötigt wird
- Cosmide** Kleine Plasmide, die in großer Kopienzahl vorkommen und sogenannte *cos*-Stellen enthalten. Sie können etwa 45 kb klonierte DNA aufnehmen.
- cos-Sequenzen** Komplementäre 12 bp lange Überhänge; finden sich an jedem Ende der linearen Form des Lambda-Genoms.
- Cosuppression** Ein anderer Ausdruck für RNA-Interferenz
- Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR)** Rezeptor auf tierischen Zellen, den Adenoviren und Coxsackieviren der Gruppe B gemeinsam haben
- C-Peptid** Verbindungspeptid der A- und der B-Ketten des Insulins; es fehlt im endgültigen Hormon.
- Cre** Eine Rekombinase des Bakteriophagen P1, die die Rekombination an spezifischen Stellen dirigiert (*loxP*-Stellen)
- CREB-Protein** (*cAMP response element binding protein*) Protein, das als Reaktion auf cAMP Gene in tierischen Zellen reguliert, indem es an CRE-Sequenzen in Promotoren bindet
- Cre/loxP** Ein System, das das Einfügen oder Entfernen eines bestimmten Gens während der Entwicklung erlaubt – unter Verwendung der Cre-Rekombinase, die DNA-Sequenzen herausschneidet, die von *loxP*-Erkennungssequenzen flankiert werden
- Cre-Rekombinase** Enzym, das von dem Bakteriophagen P1 codiert wird. Es katalysiert die Rekombination zwischen umgekehrten Sequenzwiederholungen (*loxP*-Stellen).
- CRE-Sequenz** Eine spezifische DNA-Sequenz in höheren Organismen, die sich vor Genen befindet, welche durch cAMP aktiviert werden
- Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK)** Vererbte oder spontane Degeneration des Gehirns bei Menschen, verursacht von Prionen
- Crossing-over** Eine Struktur, die sich bildet, wenn zwei DNA-Stränge brechen und sich wieder zusammenfügen
- CRP-Protein** (cAMP-Rezeptorprotein) Bakteriell Protein, das cAMP bindet und anschließend an DNA (s. CAP, Kataboliten-Aktivatorprotein)
- Cry-Protein** Kristallines Protein, das in Sporen von *Bacillus*-Bakterien vorkommt. Bei der Zersetzung wird Delta-Endotoxin (Bt-Toxin) freigesetzt.
- CTXphi** Filamentöser Bakteriophage, der Gene für das Cholera toxin trägt und *Vibrio cholerae* lyso-genisiert
- cut and paste-Transposition** Art von Transposition, bei der das Transposon komplett herausgeschnitten wird und sich als gesamte Einheit an einen anderen Ort bewegt
- Cyclin-abhängige Kinase (CDK)** Spezialisierte Proteinkinase, die durch Cyclin aktiviert wird und eine Rolle bei der Zellteilung spielt
- Cycline** Proteinfamilie, die den Zellzyklus kontrolliert
- Cysteinproteasen** Eine Gruppe von Proteasen mit Cystein in ihrem aktiven Zentrum
- cystische Fibrose** Erbliche Krankheit, bei der Epithelzellen der Luftwege absterben und durch fibröses Narbengewebe ersetzt werden. Sie ist auf Defekte des transmembranen Chloridkanals zurückzuführen.
- Cytochrom c** Mitochondriales Protein, das am Elektronentransport beteiligt ist; tritt während der Apoptose aus dem Mitochondrium aus.
- cytogenetische Chromosomenkarte** Visuelle Chromosomenkarte auf Basis eines Bandenmusters, das durch Färbung entsteht und unter einem Lichtmikroskop betrachtet werden kann
- Cytokine** Kurze Peptide, die Zellwachstum und Zellteilung stimulieren, insbesondere bei Immunzellen
- cytokine response modifier genes (crm-Gene)** Gene von Pockenviren, die die Wirkung von NK-Zellen und cytotoxischen T-Zellen beeinträchtigen
- Cytosin-Desaminase** Enzym, normalerweise aus Bakterien, das Cytosin in Uracil umwandelt
- Data-Mining** Computeranalysen zur Filterung großer Datenmengen, um nützliche Informationen zu erhalten
- Dauerlarve** Stadium des Lebenszyklus von *C. elegans*, das durch Nahrungs- und Wassermangel ausgelöst wird und von Bewegungslosigkeit und eingestellter Nahrungsaufnahme gekennzeichnet ist

db-Gen Gen, das für den Rezeptor des Hormons Leptin codiert

death-inducing signaling complex (DISC) Proteinkomplex, der durch Bindung an den Todesrezeptor aktiviert wird; die Proteine initiieren die Apoptose.

Defensin A Anti-bakterielles Peptid, hergestellt von Stechmücken

degenerierte Primer Primer mit unterschiedlichen Basen an bestimmten Positionen

Degradom Sämtliche zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter genau definierten Bedingungen exprimierte Proteasen

Dehydrogenase Enzym, das Wasserstoffatome von Substraten entfernt

Deletion Mutation, bei der eine oder mehrere Basen in der DNA-Sequenz fehlen

Delta-Endotoxin Toxin, das von dem Cry-Protein in den Verdauungstrakt von Raupen freigesetzt wird, die *Bacillus*-Sporen verdauen

Demethylasen Enzyme, die Methylgruppen entfernen

de novo-Methylase Enzym, das Methylgruppen an unmethylierte Stellen anheftet

Desoxyribose Zucker mit fünf C-Atomen, der Bestandteil der DNA ist

Desoxyribozyme Künstliche DNA-Moleküle, die als Enzyme fungieren

DHFR-Gen Gen, das für das Enzym Dihydrofolat-Reduktase codiert

Diabetes mellitus Gruppe verwandter Krankheiten, die aufgrund eines Defekts in der Insulinproduktion eine Kontrolle des Blutzuckerspiegels verhindern

Diabody Künstliches Antikörper-Konstrukt, das aus zwei Einzelketten-Fv-(scFv)-Fragmenten besteht, die miteinander verbunden sind

Dibenzothiophen (DBT) Thiophen verknüpft mit zwei Benzolringen; wird als Modellverbindung für den in Kohle und Erdöl enthaltenen organischen Schwefel angesehen.

Dicer Enzym, das doppelsträngige RNA in Fragmente schneidet, die aus 21 bis 23 Nucleotiden bestehen (siRNA)

Didesoxynucleotide Nucleotide mit einer Didesoxyribose als Zucker anstelle einer Ribose oder Desoxyribose

Differenzial-Interferenzkontrastmikroskop (s. Nomarski-Interferenzkontrastmikroskop) Spezielle Mikroskopietechnik, die Dichteunterschiede in Kontrastunterschiede verwandelt; dies ergibt ein plastisches Bild, das wie ein dreidimensionales Relief wirkt.

differenzielle Fluoreszenzinduktion (DFI) Methode, um aktive Gene in infektiösen Agenzien zu identifizieren, die möglicherweise für die Herstellung von Impfstoffen geeignet sind. Es werden Bibliotheksklone verwendet, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wurden, um festzustellen, welche Gene aktiv sind, nachdem das Pathogen in die Wirtszelle eingedrungen ist.

Dihydrofolat-Reduktase Nimmt am Kohlenstoffmetabolismus teil und wird für die Synthese von Thymin und Adenin benötigt

Dikotyle (s. Zweikeimblättrige) Pflanzen mit breiten Blättern und einer netzförmigen Aderung; besitzen zwei Keimblätter.

Dimethoxytrityl-(DMT)-gruppe Wird während der künstlichen DNA-Synthese verwendet, um die 5'-OH-Gruppen der Nucleotide zu blockieren

Dioxygenase Enzym, das durch den Einbau von zwei Sauerstoffatomen in sein Substrat Diole erzeugt

Diphtherietoxin Toxin, das von dem Bakterium *Corynebacterium diphtheriae* hergestellt wird. Es inaktiviert den Elongationsfaktor EF-2 von tierischen Zellen.

diploid Es existieren zwei Kopien von jedem Chromosom und jedem Gen.

direkter Immunoassay (*reverse-phase array*) Methode zur Proteindetektion, bei der die Proteine an einen festen Träger gebunden sind. Diese Proteine werden dann mit einem spezifisch markierten Antikörper analysiert.

DISC (death-inducing signaling complex) Proteinkomplex, der durch Bindung an den Todesrezeptor aktiviert wird; die Proteine initiieren die Apoptose.

DMD-Gen Gen auf dem X-Chromosom. Es codiert für Dystrophin und ist bei der Duchenne-Muskeldystrophie fehlerhaft.

DNA (Desoxyribonucleinsäure) Nucleinsäurepolymer, aus dem die Gene bestehen

DNA-Adenin-Methylase (Dam) Bakteriellens Enzym, das Adenin in der Sequenz GATC methyliert

DNA-Chip-Technologie Hybridisierungsmethode, bei der ein Chip verwendet wird, um simultan viele kleine DNA-Fragmente zu detektieren und zu identifizieren; auch bekannt als DNA-Array- oder Oligonucleotid-Array-Technik.

DNA-Cytosin-Methylase (Dcm) Bakteriellens Enzym, das Cytosin in den Sequenzen CCAGG oder CCTGG methyliert

DNA-Fingerprinting Individuelle Identifizierung aufgrund von Unterschieden in der DNA-Sequenz, visualisiert als Muster von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Gel

- DNA-Gyrase** Enzym, das negative Superspiralisierungen in die DNA einführt; ein Mitglied der Familie der Typ-II-Topoisomerasen
- DNA-Helicase** Enzym, das DNA-Doppelhelices entwindet
- DNA-Impfstoff** Impfstoff, bestehend aus DNA, die für ein bestimmtes Antigen des Krankheitserregers codiert. Nach dem Eindringen in den Wirt wird die DNA exprimiert, und das Immunsystem reagiert auf das fremde Protein.
- DNA-Invertase** Enzym, das spezifische Sequenzen an den beiden Enden eines invertierbaren Segments erkennt und die dazwischen liegende DNA invertiert
- DNA-Kassette** Bewusst erzeugtes DNA-Segment, das von geeigneten Restriktions- oder Rekombinationsstellen flankiert wird
- DNA-Ketten-Terminatoren** Nucleotidanaloga werden in die wachsende DNA-Kette eingebaut und verhindern eine weitere Verlängerung der Kette.
- DNA-Ligase** Enzym, das DNA-Fragmente an ihren Enden kovalent verknüpft
- DNA-Microarray** Chip, um simultan eine große Zahl von kleinen DNA-Fragmenten durch DNA-DNA-Hybridisierung zu detektieren und zu identifizieren; auch bekannt als DNA-Array-, Oligonucleotid-Array-Technik oder DNA-Chip.
- DNA-Polymerase** Enzym, das DNA-Stränge verlängert, insbesondere bei der Chromosomen-Replikation
- DNA-Polymerase III (Pol III)** Enzym, das im Rahmen der Replikation bakterieller Chromosomen einen großen Teil der DNA herstellt
- DNA-SELEX** Methode, bei der katalytisch aktive DNA-Sequenzen durch Mutationen modifiziert werden, um neue Substrate zu identifizieren
- DNA-Sequenziergerät** Gerät, das die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxy-Sequenzierungsreaktion nach Fragmentlängen auftrennt und das jeweils letzte Nucleotid eines jeden Fragments anhand seiner Farbe analysiert. Das Sequenziergerät gibt das Ergebnis in graphischer Form aus, um die DNA-Sequenz ermitteln zu können.
- DNA-Shuffling** Methode der künstlichen Evolution, bei der Gene in Segmente geschnitten, mutagenisiert, gemischt und wieder zusammengesetzt werden
- DNA-Synthesizer** Maschine, die ein Nucleotid nach dem anderen in 3'→5'-Richtung ergänzt, um DNA einer bestimmten Länge zu erzeugen
- dominant-negative Mutation** Das aufgrund einer Mutation entstandene funktionell inaktive Genprodukt inaktiviert ebenfalls das Wildtyp-Genprodukt. Tritt für gewöhnlich bei Proteinen mit mehreren Untereinheiten auf.
- Doppelhelix** Struktur aus zwei verdrehten DNA-Strängen, die einander schraubenartig umlaufen
- Dot-Blot** Hybridisierungsmethode, bei der verschiedene DNA-Proben punktförmig auf einem Filter fixiert werden. Der Blot kann dann mit einer Gen-Sonde inkubiert werden, um passende Sequenzen zu finden.
- Down-Syndrom** Fehlerhafte Entwicklung, die mit einer geistigen Retardierung einhergeht, verursacht durch eine zusätzliche Kopie von Chromosom 21
- Driver** „Normale“ DNA bei der suppressiven Subtraktionshybridisierung, die dazu benutzt wird, die häufigen DNA-Fragmente zu entfernen
- dszABC-Operon** Gruppe von Genen, die einen Weg codieren, um Schwefel von Dibenzothiophen zu entfernen
- Duchenne-Muskeldystrophie** Eine spezielle Form der Muskeldystrophie, degenerative Muskelerkrankung
- Duplikation** Mutation, bei der ein DNA-Segment dupliziert wird
- Durchflusscytometrie** Analyse (ohne Sortierung) verschiedener Zellen, die einen Fluoreszenz-Detektor passieren. Die Zellen sind mit fluoreszierenden Antikörpern markiert.
- dynamische Mutation** Mutation aufgrund von zahlreichen Tandem-repeats, die von Generation zu Generation in ihrer Zahl zunehmen
- Dystrophin** Protein, das von dem *DMD*-Gen codiert wird, dessen Ausfall Muskeldystrophie auslöst. Dystrophin spielt eine Rolle bei der Bindung der kontraktilen Filamente an die Membranen von Muskelzellen.
- E1A-Protein** Frühes Protein von Adenoviren, das andere frühe Virusgene aktiviert und an das Rb-Protein der Wirtszelle bindet
- E2F** Regulatorisches Protein, das die Synthese der Cycline E und A kontrolliert
- Ecdyson** Steroidhormon von Insekten, das an der Häutung beteiligt ist
- Ectromelia-Virus** Verwandter des Pockenvirus, das Mäuse befällt
- Einschlusskörper** Dichte Kristalle aus falsch gefalteten, funktionslosen Proteinen, die in Wirtszellen vorkommen, die ein fremdes Protein exprimieren
- Einzelketten-Fv (scFv)** Fv-Fragment eines Antikörpers mit V_H- und V_L-Domänen, die durch kurze Peptidketten verknüpft sind

Einzelketten-Fv-Fragment Technisch hergestellter Antikörper mit V_H - und V_L -Domänen, die durch kurze Peptidketten verknüpft sind

einzelstrangbindendes Protein Protein, das DNA-Einzelstränge getrennt hält

Elastin Protein, das von dem *ELN*-Gen codiert wird. Elastin ist in den elastischen Geweben von Haut, Lunge und Blutgefäßen enthalten.

Elastin-ähnliche Polypeptide (ELPs) Im Labor hergestellte Proteine, die in ihren Eigenschaften dem Elastin gleichen

elektrochemischer Detektor Gerät, das Oxidations- oder Reduktionsreaktionen von Proteinen und anderen Molekülen (in der mobilen Phase während der Chromatographie) detektieren kann

Elektroporation Technik, die mithilfe eines starken elektrischen Feldes Zellen für die Aufnahme von DNA kompetent macht

Elektrosprayionisation (ESI) Massenspektrometrie-Verfahren, bei dem Gasphase-Ionen aus Ionen, die sich in Lösung befinden, erzeugt werden

ELISA s. *enzyme-linked immunosorbent assay*

Elongation (bezogen auf die Proteinsynthese) Ein Prozess, bei dem Aminosäuren an eine wachsende Polypeptidkette angeheftet werden

Elongationsfaktoren Proteine, die für die Elongation der wachsenden Polypeptidkette benötigt werden

eluieren Entfernen gebundener Moleküle von einer Chromatographiesäule mithilfe eines Puffers, der die Säule durchläuft

embryonale Stammzellen Stammzellen, die dem Blastocystenstadium des Embryos entstammen

endgültige Differenzierung Finaler Phänotyp einer Zelle oder eines Gewebes

Endopeptidase Protease, die innerhalb der Polypeptidkette spaltet

Endotoxin Lipopolysaccharid der äußeren Membran gramnegativer Bakterien

Enhancer Regulatorische Sequenz, die sich außerhalb (häufig sehr weit entfernt) von der Promotorregion befindet; Transkriptionsfaktoren binden daran.

Enterochelin (oder **Enterobactin**) Ein Siderophor, das von *E. coli* und zahlreichen Darmbakterien benutzt wird

Enterotoxin Proteintoxin, das von Darmbakterien sekretiert wird

Enteroviren Gruppe kleiner RNA-Viren, die den Darm von Tieren infizieren; das Poliovirus gehört dazu.

Entkopplung (bei Mitochondrien) Trennung der Aktivität der Atmungskette von der ATP-Produktion.

Die entstehende Energie wird in Form von Wärme frei.

Entkopplungsprotein (UCP) Protein, das die Atmungskette in Mitochondrien entkoppelt und Wärme freisetzt

Entomesoderm Mesoderm, das sich vom Entoderm einer zweilagigen Keimscheibe ableitet

Enviro-pig™ Transgenes Schwein, dessen Mist einen deutlich geringeren Phosphorgehalt hat

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Empfindliche Methode, um mithilfe von Antikörpern die Menge eines bestimmten Proteins in einer Probe zu bestimmen

epigenetische Veränderungen 1. Erbliche Veränderungen, die nicht auf einer Modifikation der DNA-Sequenz beruhen. 2. Änderungen in der Genregulation, die nach einer Gewebekultur auftreten und von den Nachkommen der Pflanze nicht weitervererbt werden

Epitope Begrenzte Regionen eines Antigens, an die ein Antikörper bindet

EPSPS Enzym, das essenziell für die Synthese aromatischer Aminosäuren in Pflanzen und Bakterien ist

erblich Ein Merkmal, das von den Eltern an die Nachkommen weitergegeben wird

Ereignis Bezeichnet verschiedene Insertionen des gleichen Transgens. Das Transgen ist jeweils identisch, aber die Orte der Integration unterscheiden sich.

Erhaltungsmethylasen Enzyme, die Methylgruppen an die neu synthetisierte DNA an den Stellen anheften, an denen nur ein Strang methyliert ist

error prone-PCR PCR-Typ, bei dem im Rahmen der Amplifikation zufällige Mutationen in die Sequenz eingeführt werden

erworbene Immunität Art von Immunität, welche über einen Zeitraum von mehreren Tagen auf spezifische Antigene reagiert. Sie kann zwischen „Eigen“ und „nicht-Eigen“ unterscheiden, „erinnert“ sich an Pathogene, die bereits in den Körper eingedrungen sind, und löst die Antikörperproduktion aus.

erworbenes Immunschwächesyndrom (Aids) Eine Krankheit, ausgelöst durch das Retrovirus HIV, die langsam das Immunsystem unterminiert, indem sie die T-Zellen zerstört

Erythromycin Antibiotikum aus der Makrolid-Familie, das die Proteinsynthese inhibiert

Erythropoetin Ein für die Entwicklung von roten Blutkörperchen erforderliches Protein

Escherichia coli Eine Bakterienspezies, die häufig in der Genetik und Molekularbiologie eingesetzt wird

- essbare Impfstoffe** Impfstoffe, die innerhalb von essbaren Pflanzenteilen produziert werden. Das Verzehren des Impfstoffs würde Resistenz gegen die Krankheit verleihen.
- Ethidumbromid** Ein Farbstoff, der an DNA und RNA bindet. Er erscheint orange, wenn er mit ultraviolettem Licht bestrahlt wird.
- Eugenik** Beabsichtigte Verbesserung der menschlichen Rasse (oder anderer Spezies) durch selektive Fortpflanzung
- Exon** Gensegment, das für ein Protein codiert. Es ist auch nach der Prozessierung in der mRNA vorhanden.
- Exopeptidase** Protease, die entweder am C- oder N-Terminus der Polypeptidkette schneidet
- Exotoxin** Proteintoxin, sekretiert von Bakterien
- Explantat** Gewebe, das einer Pflanze entnommen und in ein künstliches Nährmedium überführt wird, um es zum Wachstum anzuregen und zu kultivieren
- expressed sequence tag (EST)** Ein spezieller STS-Typ, abgeleitet von einer DNA-Region, die durch Transkription in mRNA exprimiert wurde
- Expressionsbibliothek** Eine Bibliothek, bei der jedes klonierte DNA-Stück mithilfe des Vektors in ein Protein translatiert wird. Siehe auch Expressionsvektor.
- Expressionsvektor** Vektor, der entwickelt wurde, um die Genexpression zu verstärken. Dies geschieht in der Regel durch die Bereitstellung eines starken Promotors, der die Expression des klonierten Gens antreibt.
- Exprimierung** (bezogen auf Gene) Umwandlung einer DNA-Region in RNA und/oder Protein zur Verwendung in einer lebenden Zelle
- ex vivo-Gentherapie** Gentherapie, bei der einem Patienten Zellen entnommen werden; diese werden anschließend modifiziert und ihm wieder eingepflanzt.
- Fab-Fragmente** Antigen-bindende Fragmente eines Antikörpers
- α -Faktor** Kreuzungsfaktor der Hefe, der als Pheromon wirkt und Hefezellen des anderen Kreuzungstyps anzieht
- Faktor für die Eiskeimbildung** Protein, das als Kristallisationskeim für die Eisbildung fungiert
- fakultatives Heterochromatin** Heterochromatin, das die Fähigkeit besitzt, sich in normales Euchromatin umzuwandeln
- 30-nm-Faser** Helikal angeordnete Kette von Nucleosomen mit ungefähr 30 nm Durchmesser
- Fc-Fragment** Stammregion eines Antikörpers; das Fragment, das nicht das Antigen bindet
- Fehlpaarungsreparatursystem** DNA-Reparatursystem, das falsch gepaarte Basen erkennt und den Teil des DNA-Stranges ausschneidet, der die falsche Base enthält
- Ferritin** Protein zur Eisenspeicherung bei Tieren
- Fierce Mouse** Transgene Maus mit erhöhter Aggressivität
- Filoviren** Familie von Minusstrang-ssRNA-Viren wie das Ebola- und das Marburg-Virus
- Fimbrien** (Singular Fimbrie) Dünne, helikale Proteinfilamente, die sich auf der Oberfläche von Bakterien befinden (identisch mit Pili)
- FLAG-Tag** Kleiner Peptid-Tag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys), der von einem spezifischen Anti-FLAG-Antikörper gebunden wird und an Proteine angeheftet werden kann
- Flippase** (identisch mit Flp-Rekombinase oder Flp-Protein) Enzym, das von dem 2- μ m-Plasmid der Hefe codiert wird. Es katalysiert die Rekombination zwischen invertierten Sequenzwiederholungen (FRT).
- Floral-dip-Methode** (wird auch *in planta*-Transformation genannt) Methode, bei der ein Transgen, befördert von Bakterien der Gattung *Agrobacterium*, in *Arabidopsis* transformiert wird. Hierbei wird die Pflanze in eine Suspension mit *Agrobacterium* getaucht, die eine oberflächenaktive Substanz enthält.
- Flp-Protein** Enzym, das von dem 2- μ m-Plasmid der Hefe codiert wird. Es katalysiert die Rekombination zwischen invertierten Sequenzwiederholungen (FRT).
- Flp-Rekombinase** (identisch mit Flippase oder Flp-Protein) Enzym, das von dem 2- μ m-Plasmid der Hefe codiert wird. Es katalysiert die Rekombination zwischen invertierten Sequenzwiederholungen (FRT).
- Flugrohr** Röhre, in der Ionen, die bei der Massenspektrometrie erzeugt werden, nach Ladung oder Größe getrennt werden
- Flugzeitdetektor (TOF)** Typ eines Massenspektrometers, das die Flugzeit eines Ions von der Ionenquelle bis zum Detektor misst
- fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)** Technik zur Sortierung von Zellen (oder Chromosomen) basierend auf einer Fluoreszenzmarkierung
- Fluoreszenzdetektor** Detektor, der Fluoreszenz detektiert, die von einer mobilen Phase emittiert wird (angeregt durch Licht)
- Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)** Eine fluoreszierende Sonde wird dazu verwendet, um

ein DNA- oder RNA-Molekül an seinem natürlichen Ort zu visualisieren.

FokI Ein spezielles Typ-II-Restriktionsenzym, mit separaten Erkennungs- und Endonucleasedomänen

Folgestrang Der neue DNA-Strang, der während der Replikation in Form kleiner Stücke synthetisiert und später verknüpft wird

fragiles-X-Syndrom Mikroskopisch erkennbarer, erblicher Defekt, der eine fragile Stelle im langen Arm des X-Chromosoms zur Folge hat

Francisella tularensis Bakterium, das Tularämie verursacht

Freisetzungsfaktor Protein, das ein Stoppcodon erkennt und bewirkt, dass die fertige Polypeptidkette sich vom Ribosom löst

Fremdbestäubung Pollen einer Pflanze wird auf die Narbe einer anderen Pflanze aufgebracht, um den Austausch der genetischen Information zu steuern.

FRT Erkennungsstelle für die FLP-Rekombinase

frühe Gene Gene, die früh während der Virusinfektion exprimiert werden und hauptsächlich für Enzyme codieren, die an der DNA- oder RNA-Replikation des Virus beteiligt sind

funktionelle Genomik Untersucht das komplette Genom und dessen Expression.

funktionelle Klonierung Dieser Ansatz geht von einem bekannten Protein aus, von dem man annimmt, dass es an einer genetischen Störung beteiligt ist.

G₀-Phase Ruhephase, in der eukaryotische Zellen weder wachsen noch sich teilen

G₁-Phase Erstes Stadium des eukaryotischen Zellzyklus, in dem das Zellwachstum stattfindet

G₂-Phase Drittes Stadium des eukaryotischen Zellzyklus, in dem sich die Zelle auf die Teilung vorbereitet

G-418 Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside, das tierische Zellen abtötet, indem es die Proteinsynthese blockiert; auch bekannt als Genectin.

β-Galactosidase Enzym, das Lactose und verwandte Disaccharide in Einfachzucker spaltet

Gal4-Protein Transkriptionsaktivator der Hefe; besitzt eine DNA-Bindungsdomäne und eine Aktivierungsdomäne für die Transkription.

Ganciclovir Nucleosidanalogon; wird von Zellen in einen DNA-Kettenterminator umgewandelt. Wird gegen Virusinfektionen und in der Krebstherapie eingesetzt.

Gangliosid GM1 Glykolipid, das in eukaryotischen Zellmembranen vorkommt. Es wird von dem Choleratoxin als Rezeptor genutzt.

GC-Verhältnis Der Anteil von G und C im Verhältnis zu allen vier Basen in einer DNA-Probe. Das GC-Verhältnis wird für gewöhnlich in Prozent angegeben.

Gedächtniszellen B-Zellen, die auf eine mögliche Infektion warten, anstatt Antikörper zu produzieren

Gelelektrophorese Elektrophorese geladener Moleküle durch das Maschenwerk eines Gels, um sie nach ihrer Größe aufzutrennen

Genbibliothek Kollektion klonierter DNA-Abschnitte, die umfangreich genug ist, um mindestens eine Kopie eines jeden Gens eines Organismus zu beinhalten; identisch mit DNA-Bibliothek.

Genchirurgie Weniger häufiger Name für Gensatztherapie

Genectin (G-418) Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside, das tierische Zellen abtötet, indem es die Proteinsynthese blockiert

GENE impedance (GENEi) Ein anderer Ausdruck, um RNA-Interferenz zu beschreiben. Wurde vorgeschlagen, um alle verschiedenen Phänomene zusammenzufassen, die den Abbau eines speziellen RNA-Transkripts induzieren und an denen kurze interferierende RNAs beteiligt sind.

Genersatztherapie Heilung erblicher Defekte durch Einführen einer funktionstüchtigen Kopie des defekten Gens

„genetische Einheiten“ Bestehen primär aus genetischer Information. Sie besitzen manchmal eine schützende Hülle, haben aber nicht die Fähigkeit, Energie zu erzeugen oder Makromoleküle zu replizieren.

genetische Marker Orientierungspunkte genetischen Ursprungs, um Genkarten zu konstruieren, wie Gene oder SNPs

genetische Regulationskreise Kombination aus Genen, Promotoren, Enhancern und Repressoren, die die Expression eines finalen Genprodukts reguliert

genetische Veränderungen Veränderungen in Pflanzen nach einer Gewebekultur, die von den Nachkommen weitervererbt werden (auch Veränderungen in den Chromosomen)

genetisches Imprinting (genetische Prägung) Wenn die Expression eines bestimmten Allels davon abhängt, ob es ursprünglich von der Mutter oder vom Vater kommt (genetisches Imprinting ist eine seltene Ausnahme von der Regel der genetischen Dominanz)

Genfamilie Gruppe nahe verwandter Gene, die durch wiederholte Duplikationen entstanden sind und ähnliche Aufgaben erfüllen

- Genfusion** Struktur, bei der Teile zweier Gene zusammengefügt werden, insbesondere wenn die regulatorische Region eines Gens mit der codierenden Region eines Reportergens verknüpft ist
- Genkarten** Karten von genetischen Markern und/oder Genen, basierend auf Rekombinations-Informationen, ohne die exakten Distanzen in Basenpaaren anzugeben
- Genkassette** Einfaches genetisches Element, das ein oder zwei offene Leseraster enthält, flankiert von sich wiederholenden Sequenzen (als 59-be oder *attC* bezeichnet); wird in Integrons eingebaut.
- Genom-Browser** Computerprogramm mit graphischen Darstellungsmöglichkeiten, das dem Wissenschaftler erlaubt, das komplette Genom eines Organismus zu betrachten, um interessierende Regionen oder Gene zu identifizieren
- Genomkarten** Graphische Darstellung eines Genoms
- Gensuperfamilie** Gruppe nahe verwandter Gene, die durch sukzessive Duplikationen entstanden ist. Mitglieder einer Superfamilie haben sich manchmal so weit auseinander entwickelt, dass ihre gemeinsame Herkunft kaum noch zu erkennen ist.
- Gentest** Analyse der DNA-Sequenz, um bei Patienten mögliche Krankheiten zu identifizieren
- Gentherapie** Medizinische Behandlung unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken. Ursprünglich entwickelt, um erbliche Defekte durch das Einbringen funktionstüchtiger Gene zu heilen.
- gerichtete Evolution** Technik, um die ursprüngliche Aktivität eines Enzyms zu ändern oder zu verstärken. Dies geschieht durch zufallsbedingte Mutagenese des interessierenden Gens und eine nachfolgende Selektion der neuen Funktion.
- gezielte Mutagenese** Bewusste Modifizierung der DNA-Sequenz eines Gens mithilfe verschiedener Techniken
- Ghrelin** Peptidhormon, das Hunger signalisiert
- glatte Enden** Doppelsträngige DNA, ohne ungepaarte, überstehende Einzelstrangenden
- Gleitklammer** Untereinheit der DNA-Polymerase, die die DNA umschließt und das Core-Enzyme auf der DNA hält
- Glucocorticoidhormone** Gruppe von Steroidhormonen bei Säugetieren, die den Wasser- und Ionenhaushalt beeinflussen
- Glutathion-S-Transferase (GST)** Enzym, das an das Tripeptid Glutathion bindet; wird häufig zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet.
- Glykogen** Polymer aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, das als Speicherpolysaccharid bei Tieren und Bakterien vorkommt
- Glyphosat** Unkrautbekämpfungsmittel, das die Synthese von aromatischen Aminosäuren in Pflanzen inhibiert
- gp120** Ein in der äußeren Virushülle von HIV vorkommendes Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 120 kDa. Es bindet an CD4 der Wirtszelle, was zum Eindringen des Virus führt.
- G-Proteine** Klasse GTP-bindender eukaryotischer Proteine, die an der Signalübermittlung beteiligt sind
- grün fluoreszierendes Protein (GFP)** Protein aus Quallen, das grünes Licht emittiert und häufig bei genetischen Analysen eingesetzt wird
- Gründertier** Ursprünglicher Empfänger des Transgens; hat das Transgen stabil integriert.
- Guanylat-Cyclase** Enzym, das cGMP synthetisiert
- Haarnadel** Doppelsträngige Struktur, bestehend aus gepaarten Basenpaaren. Sie entsteht, wenn sich eine einzelsträngige DNA oder RNA zurückfaltet und mit sich selbst paart.
- Haarnadelribozyme** Kleine katalytische RNA-Moleküle mit vier Helices um zwei interne Schleifen
- Halbleiter** Material, das bezüglich seiner elektrischen Leitfähigkeit zwischen einem Leiter und einem Isolator liegt. Der elektrische Strom bewegt sich in Form von „Löchern“ fort, die von Atom zu Atom wandern.
- Hammerkopfribozyme** Kleine katalytische RNA-Moleküle mit drei Helices um eine Kernschleife
- Hämolyisin** Proteintoxin, das rote Blutkörperchen lysiert
- haploide Sporen** Verbreitungseinheit von Pilzen, die von allen Genen nur eine Kopie trägt (wird gewöhnlich von Organismen verwendet, die über zwei oder mehr Gensets verfügen)
- Haploinsuffizienz** Situation, bei der ein Defekt in einer der beiden Kopien eines diploiden Gens deutliche phänotypische Defekte verursacht
- Haushaltsgene** Gene, die dauerhaft aktiv sind, da sie für lebenswichtige Funktionen benötigt werden
- Hefe-Prionen** Hefeproteine, die sich in gewisser Weise wie Prion-Proteine von Säugetieren verhalten
- „heiß“** Umgangssprachlicher Ausdruck für radioaktiv
- Helfervirus** Virus, das wichtige Funktionen für defekte Viren, Satellitenviren und Satelliten-RNA zur Verfügung stellt
- helper component proteinase (Hc-Pro)** Polyvirales Protein, das die Anreicherung pflanzlicher siRNAs

hemmt, aber keinen Effekt auf die Ausbreitung des RNAi-Signals in andere Pflanzenteile hat

Hemicellulose Gemisch aus Polymeren, das in pflanzlichen Zellwänden vorkommt. Es besteht aus verschiedenen Zuckern wie Glucose, Manno- se, Galactose, Xylose und Arabinose.

hemimethyliert Nur ein Strang ist methyliert.

Hepatitisdeltavirus (HDV) Einzelsträngiges RNA- Satellitenvirus mit Ribozymaktivität

Herceptin Handelsname von Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper des HER2-Rezeptors von metastasierten Brustkrebszellen. Er wird zur therapeu- tischen Behandlung eingesetzt, um Wachstum und Ausbreitung von Krebszellen zu blockieren.

Herpesviren Familie von Viren, die eine Vielzahl von Krankheiten auslösen, manchmal auch Tu- moren. Sie beinhalten dsDNA und eine äußere Hülle, die das Nucleocapsid umgibt.

Heterochromatin Stark kondensierte Form des Chro- matins, die nicht transkribiert wird, da die RNA- Polymerase keinen Zugang hat

heterolog Abgeleitet von einer anderen Spezies

Heteroplasmie Die Existenz verschiedener Mito- chondrien- oder Chloroplastengenome in einem einzigen Individuum

Hexon Proteinuntereinheit des Viruscapsids mit einer sechszähligen Symmetrie, die deshalb von sechs benachbarten Untereinheiten umgeben ist

His6 Reihe von sechs Histidinresten, die an Proteine angehängt wird, um die Reinigung durch Bindung an Nickelionen (fixiert an einer Säule) zu ermögli- chen. Auch bekannt als Polyhistidin-Tag.

Histon-Acetyltransferase (HAT) Enzym, das Ace- tylgruppen an Histone anheftet

Histon-Deacetylase (HDAC) Enzym, das Acetyl- gruppen von Histonen entfernt

Histone Spezielle positiv geladene Proteine, die an DNA binden und helfen, die Struktur der Chro- mosomen in Eukaryoten aufrechtzuerhalten

hitzestabile orale Impfstoffe Impfstoffe, die her- gestellt werden, indem ein Krankheitsantigen in pflanzlichem Blattgewebe exprimiert wird. Nach- dem das Blattgewebe sich entwickelt hat, kann es gefriergetrocknet und in Kapseln gefüllt werden, sodass eine weitere Kühlung unnötig ist.

HIV (*human immunodeficiency virus*) Ein Mitglied der Familie der Retroviren, das Aids verursacht

HLA-Gene Genfamilie, die für Proteine codiert, die sich auf der Oberfläche von Zellen befinden und an der Zellerkennung beteiligt sind

Hochleistungsflüssigkeits- oder Hochdruckflüssig- keits-Chromatographie (HPLC) Variante der

Chromatographie, bei der ein Molekülmix (mo- bile Phase) über einer stationären Phase unter hohem Druck aufgetrennt wird

homologe Cosuppression Form der RNA-Interfe- renz, bei der mehrere Kopien eines Transgens die Expression verwandter Wirtsgene reduzieren

homologe Rekombination Rekombination oder ge- netischer Austausch zwischen zwei DNA-Strän- gen, die identisch bzw. fast identisch in ihrer Sequenz sind

Homoplasmie Zustand, bei dem die gesamte Popu- lation der Mitochondrien innerhalb eines Indivi- duums einheitlich ist

Hormone Moleküle, die innerhalb eines vielzelligen Organismus Signale übertragen

human immunodeficiency virus (HIV) Ein Mitglied der Familie der Retroviren, das Aids verursacht

humane Leukocytenantigene (HLAs) Anderer Name für die Proteine des Haupthistokompatibili- täts-Komplexes (MHC) beim Menschen; kommen auf der Oberfläche der weißen Blutzellen vor.

humaner Faktor IX Ein Protein, das bei der Blutge- rinnung eine Rolle spielt

humanes Choriongonadotropin (hCG) Hormon, das während der Schwangerschaft von der Plazenta gebildet wird

humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) Virus aus der Fa- milie der Herpesviren; verursacht das bei Aidspa- tienten häufig vorkommende Kaposi-Sarkom.

Humanisierung (eines Antikörpers) Ersetzen aller Proteinanteile – außer der Antigen-Bindungsre- gion – durch humane Proteinanteile (codiert von humanen Sequenzen)

humorale Immunität Wird durch B-Zellen vermit- telt, die Antikörper produzieren

Hybridisierung Paarung von DNA- oder RNA- Einzelsträngen aus zwei verschiedenen (aber ver- wandten) Quellen zur Bildung eines Doppelhelix- hybrids

Hybridomzelle Eine von Wissenschaftlern herge- stellte Zelle, bei der eine Antikörper-produzieren- de Zelle (B-Zelle) mit einer Myelomzelle fusio- niert wird, um eine immortale Zelle zu schaffen, die einen spezifischen monoklonalen Antikörper produziert

Hydrolase Enzym, das Substrate durch Hydrolyse abbaut

ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül 1) Pro- tein auf der Oberfläche tierischer Zellen; dient als Rezeptor für zahlreiche Picornaviren.

IGF-1-Gen Gen, das für den *insulin-like growth fac- tor 1* codiert

- Immuncytochemie** Technik zur Sichtbarmachung spezieller zellulärer Proteine mithilfe von Antikörpern. Wenn ein Antikörper an ein Protein bindet, offenbart die Markierung dessen Position.
- Immunglobulin G (IgG)** Gruppe von Antikörpern mit einer schweren Kette aus der γ -Klasse
- Immunglobuline** Ein anderer Ausdruck für Antikörper
- Immunhistochemie** Technik zur Sichtbarmachung spezieller zellulärer Proteine in einem Gewebeabschnitt mithilfe von markierten Antikörpern
- Immunitätsprotein** Protein, das Immunität verleiht. Spezielle Bacteriocin-Immunitätsproteine binden an entsprechende Bacteriocine und machen diese unschädlich.
- immunologisches Gedächtnis** Erinnerung an ein Antigen, welchem das Immunsystem bereits begegnet ist; wird durch spezialisierte B-Zellen vermittelt.
- Impfung** Künstliche Induktion einer Immunantwort durch Injektion fremder Proteine oder anderer Antigene
- 30S-Initiationskomplex** Translations-Initiationskomplex, der lediglich die kleine Untereinheit des bakteriellen Ribosoms enthält
- 70S-Initiationskomplex** Translations-Initiationskomplex, der beide Untereinheiten des bakteriellen Ribosoms enthält
- in planta-Transformation mit *Agrobacterium*** (s. Floral-dip-Methode) Methode, bei der ein Transgen, befördert von Bakterien der Gattung *Agrobacterium*, in *Arabidopsis* transformiert wird. Hierbei wird die Pflanze in eine Suspension mit *Agrobacterium* getaucht, die eine oberflächenaktive Substanz enthält.
- in vivo-induzierte Antigentechnologie (IVIAT)** Methode zur Identifizierung von Genen, die aktiv sind, nachdem ein Erreger in eine Zelle eingedrungen ist. Die Technik identifiziert Antikörper des Patienten gegen das infektiöse Agens.
- inaZ-Gen** Gen, das für das Protein für die Eiskernbildung von *Pseudomonas syringae* codiert
- Indigo** Leuchtend blauer Farbstoff, der auf dem Indol-Ringsystem basiert
- Indole** Ringsysteme, die Stickstoff enthalten und bei Tryptophan und Indigo vorkommen
- Induktoren (Signalmoleküle)** Moleküle, die einen regulatorischen Effekt ausüben, indem sie an ein regulatorisches Protein binden
- induzierbarer Promotor** Promotor, der nur unter bestimmten Bedingungen funktioniert
- Influenzavirus** Mitglied der Orthomyxovirus-Familie mit acht separaten ssRNA-Molekülen
- Initiationsfaktoren** Proteine, die für die Initiation einer neuen Polypeptidkette benötigt werden
- Initiatorregion** Sequenz am Startpunkt der Transkription eines eukaryotischen Gens
- Insertion** Mutation, bei der eine oder mehrere Basen zusätzlich in die DNA-Sequenz integriert sind
- Insertionsinaktivierung** Inaktivierung eines Gens durch den Einbau eines fremden DNA-Segments inmitten der codierten Sequenz
- Insulin** Kleines Proteinhormon, das in der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) produziert wird. Es kontrolliert die Zuckerkonzentration im Blut.
- insulin-like growth factor 1 (IGF-1)** Peptid, das das Wachstum und die Teilung bestimmter tierischer Zellen stimuliert
- Insulinrezeptor** Protein auf der Oberfläche von Zellen, das als Rezeptor für Insulin fungiert
- Integrase (*intI*)** Enzym, das ein dsDNA-Segment an einer spezifischen Erkennungsstelle in ein anderes DNA-Molekül einbaut. So baut beispielsweise Lambda-Integrase Lambda-DNA in das Chromosom von *E. coli* ein.
- Integron** Genetisches Element, bestehend aus einer Integrationsstelle (für eine Genkassette) und einem Gen, das für eine Integrase codiert
- Integronanalyse** Identifizierung von Genen, die in Integrons eingebettet sind, um nützliche Gene aus der Umwelt zu ermitteln
- Intein** Selbstspaltende, intervenierende Sequenz, die in Proteinen vorkommt
- Interferon- γ (INF γ)** Protein, das in tierischen Zellen als Reaktion auf intrazelluläre Pathogene induziert wird
- Interferone (INF)** Proteinfamilie, die in tierischen Zellen als Reaktion auf Virusinfektionen oder intrazelluläre Pathogene induziert wird
- Interferone α und β (INF α und INF β)** Proteine, die bei Virusinfektionen in tierischen Zellen induziert werden und eine antivirale Antwort auslösen
- Interleukin 4 (IL-4)** Ein Cytokin, das unter anderem die Teilung von B-Zellen anregt, die Antikörper synthetisieren
- Interleukine** Untergruppe der Cytokine, die an der Entwicklung von Zellen des Immunsystems beteiligt sind
- internal ribosomal entry sites (IRES-Elemente)** Sequenzen, die eine Translation mehrerer codierender Sequenzen mit derselben Botschaft in eukaryotischen Zellen ermöglichen. IRES-Sequenzen kommen bei einigen Tierviren vor.

Intron Gensegment, das nicht für ein Protein codiert; es wird aber transkribiert und ist Teil des Primärtranskripts.

Invasin Bakteriell Protein, das tierische Zellen dazu bringt, die Bakterien aufzunehmen

inverse PCR Methode, um unbekannte Sequenzen mithilfe der PCR zu amplifizieren, indem man die Matrizen-DNA zu einem Ring schließt

Inversion Mutation, bei der ein DNA-Segment eine umgekehrte Orientierung angenommen, aber seine Position beibehalten hat

Invertase (genau genommen DNA-Invertase) Enzym, das spezifische Sequenzen an den beiden Enden eines invertierbaren Segments erkennt und die dazwischen liegende DNA invertiert

Ionenaustauschchromatographie Chromatographie-Technik, die ungeladene von geladenen Molekülen trennt. Die stationäre Phase hat eine Nettoladung, die geladene Moleküle anzieht, neutrale hingegen durchlässt.

Ionenkanäle im Nanomaßstab Kleine Kanäle im Nanomaßstab, die mithilfe biologischer Moleküle geschaffen werden, die Löcher in Membranen einfügen. Sie erlauben den Durchtritt von Ionen unter kontrollierten Bedingungen.

IPTG (Isopropylthiogalactosid) Ein künstlicher Induktor des *lac*-Operons

IRES-Elemente Ein anderer Ausdruck für *internal ribosomal entry sites*

isoelektrische Fokussierung Technik, um mithilfe der Elektrophorese durch einen pH-Gradienten Proteine nach ihrer natürlichen Ladung aufzutrennen

Isoform Eine von verschiedenen alternativen Formen eines Proteins, die von dem gleichen Gen codiert werden. Sie unterscheiden sich aufgrund eines alternativen Spleißens der mRNA oder einer alternativen Prozessierung des Vorläuferproteins

isolatorbindendes Protein (IBP) Protein, das an die Isolatorsequenz bindet und sicherstellt, dass der Isolator funktioniert

Isolatoren DNA-Sequenzen, die Promotoren vor der Wirkung von Enhancern abschirmen und die Ausbreitung des Heterochromatins unterbinden

JNK (Jun N-terminal kinase) Ein eukaryotisches Protein, das eine Phosphatgruppe auf AP-1 überträgt und so die Gentranskription aktiviert

junk DNA Ein Ausdruck, um fehlerhafte und für die Zelle „unnütze“ DNA zu beschreiben. Sie ist inaktiv und kann keine Gene exprimieren.

Kallus Eine unorganisierte, wuchernde Masse undifferenzierter Pflanzenzellen

Kalluskultur Dedifferenzierung von Pflanzengewebe *in vitro*, um anschließend das undifferenzierte Gewebe in einer Petrischale zum Wachstum zu bringen

„kalt“ Umgangssprachlicher Ausdruck für nichtradioaktiv

Kandidaten-Klonierung Klonierungsansatz, der sich auf eine begründete Vermutung stützt, welches Protein an einer bestimmten Erbkrankheit beteiligt ist

Kappa-Partikel Symbiontische Bakterien (*Caedibacter*), die innerhalb einer *Paramecium*-Zelle (Killer) wachsen und Toxin produzieren

Karzinogen Krebsauslösender Faktor

Katalase Enzym, das Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser umwandelt

Keimzellen Reproduktive Zellen, die Eizellen oder Spermien produzieren und bei der Bildung der nächsten Generation mithelfen (bei Eukaryoten)

Kernhülle Zwei konzentrische Membranen, die den Kern eukaryotischer Zellen umhüllen

Kernpore Pore in der Kernmembran, die es Proteinen, RNA und anderen Molekülen erlaubt, in den Kern oder aus ihm heraus zu gelangen

Kernrezeptoren Eine große Familie von Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren fungieren; beinhaltet Rezeptoren für viele schlecht wasserlösliche Hormone.

Kerntransplantation Technik, bei der ein Kern von einer Zelle in eine andere entkernte Zelle transplantiert wird

Kettenabbruchsequenzierung DNA-Sequenzierungsmethode, die Didesoxynucleotide nutzt, um die Synthese von DNA-Strängen zu stoppen. Ist identisch mit der Didesoxy-Sequenzierung.

Kettenterminator Nucleosidanalogon, das in die wachsende DNA-Kette eingebaut wird, aber die weitere Kettenverlängerung verhindert

Killer *Paramecium*, das Kappa-Partikel trägt und somit in der Lage ist, empfindliche Paramecien zu töten

Klade Eine Gruppe von Organismen, die einen gemeinsamen evolutionären Vorfahren haben

Kladistik System zur biologischen Klassifizierung, basierend auf quantitativen Analysen physischer Merkmale, zur Offenlegung evolutionärer Beziehungen

Klammerbeladungs-Komplex Eine Gruppe von Proteinen, die die Positionierung der Gleitkammer der DNA-Polymerase um die DNA ermöglichen

Klasse-I-Hapthistokompatibilitäts-Komplex (Klasse-I-MHC) MHC-Proteine, die aus zwei Ketten

unterschiedlicher Länge bestehen und sich auf der Oberfläche aller Zellen finden. Ihre Aufgabe besteht darin, Proteinfragmente zu präsentieren, die im Inneren der Zelle entstehen.

Klasse-II-Hapthistokompatibilitäts-Komplex (Klasse-II-MHC) MHC-Proteine, die aus zwei Ketten gleicher Länge bestehen und sich nur auf der Oberfläche bestimmter Immunzellen finden. Ihre Aufgabe besteht darin, Proteinfragmente von verdauten Mikroorganismen zu präsentieren.

Klonierungsvektor Ein DNA-Molekül, das sich selbst innerhalb einer Zelle replizieren kann. Es wird genutzt, um klonierte Gene oder DNA-Fragmente zu tragen. Meist ist es ein kleines, in hoher Kopienzahl vorkommendes Plasmid oder ein modifiziertes Virus.

Klontiere Genetisch identische Tiere, die von derselben Zelllinie stammen

Knockout-Mäuse Mäuse, die Gene enthalten, die über einen gentechnischen Prozess inaktiviert wurden, für gewöhnlich durch Insertion einer DNA-Kassette, die die codierende Sequenz zerstört

Knospe Eine neue asexuelle Tochterzelle einer Hefe, die durch eine Ausbeulung auf der Oberfläche der Mutterzelle entsteht

Köderprotein (*bait*) Fusion der DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsaktivators mit einem weiteren Protein; kommt bei der Two-Hybrid-Analyse zum Einsatz.

kohäsives Ende Ende eines doppelsträngigen DNA-Moleküls, das einen ungepaarten, einzelsträngigen Überhang aufweist, entstanden durch einen versetzten Schnitt

kombinatorische Bibliothek Eine große Serie von verwandten Molekülen, die systematisch erzeugt wurden, indem man chemische Gruppen und/oder molekulare Motive kombinierte

kombinatorisches Screening Screening einer großen Serie von verwandten Molekülen, um solche mit nützlichen Eigenschaften zu finden

kompetente Zellen Zellen, die DNA aus dem umgebenden Medium aufnehmen können

komplementäre DNA (cDNA) DNA-Kopie eines Gens (ohne Introns); besteht ausschließlich aus der codierenden Sequenz. Entsteht durch reverse Transkription von mRNA.

α -Komplementation Zusammenbau einer funktionellen β -Galactosidase mit dem α -Fragment und dem Rest des Proteins

komplexe Transposons Transposons, die sich durch replikative Transposition bewegen

konditionale Mutation Mutation, bei der die phänotypische Ausprägung von den Umweltbedingungen abhängt, wie beispielsweise von Temperatur oder pH-Wert

Konjugation Prozess, bei dem Gene durch einen Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen Bakterien übertragen werden

konservative Substitution Austausch einer Aminosäure gegen eine andere, die ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften hat

konservative Transposition Das gleiche wie *cut and paste*-Transposition

konstante Region Region eines Antikörpers, die eine konstante Sequenz besitzt

konstitutiv Begriff, der Gene beschreibt, die unter allen Bedingungen exprimiert werden

konstitutiver Promotor In allen Geweben dauerhaft aktiver Promotor

konstitutives Heterochromatin Regionen mit mehr oder weniger konstantem Heterochromatin. Findet sich auf beiden Kopien homologer Chromosomen, speziell im Bereich der Centromere.

Konstrukt Ein Vektor, der aus verschiedenen Genen und DNA-Segmenten zusammengesetzt ist

Kontakthemmung Inhibierung der Zellteilung durch einen Kontakt zu benachbarten Zellen

Kopienzahl Anzahl der Kopien eines Gens oder Plasmids innerhalb einer einzelnen Wirtszelle

Krebs Gewebe oder Zellcluster, entstanden durch unkontrolliertes Zellwachstum und unkontrollierte Zellteilung. Die Ursache sind somatische Mutationen, die die Zellteilung beeinflussen.

künstliche Chromosomen Selbstreplizierende Elemente, die genutzt werden, um große DNA-Fragmente zu klonieren. Sie besitzen drei Hauptkomponenten: einen Replikationsursprung, ein Centromer und Telomere.

künstlicher Induktor Molekül (für gewöhnlich künstlich hergestellt), das ein Gen induziert, aber nicht wie das natürliche Substrat metabolisiert wird; das bekannteste Beispiel ist die Induktion des *lac*-Operons durch IPTG.

Kuru Eine degenerative Erkrankung bei Kannibalen, die von Prionen verursacht wird

kurze Haarnadel-RNA (shRNA) Genetisch hergestellte RNA mit komplementären Sequenzen, die durch Faltung doppelsträngig werden. Wird genutzt, um die RNA-Interferenz zu aktivieren.

kurze interferierende RNA (siRNA) Doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21–22 Nucleotiden, die daran beteiligt ist, RNA-Interferenz bei Eukaryoten auszulösen

LacI-Repressor Repressorprotein, das das *lac*-Operon kontrolliert

β -Lactam-Antibiotika Große Familie von Antibiotika, zu der die Penicilline und Cephalosporine gehören

β -Lactamase Enzym, das β -Lactam-Antibiotika abbaut

Lactat-Dehydrogenase (LDH) Enzym, das die wechselseitige Umwandlung von Pyruvat und Lactat katalysiert

Lactoferrin Ein Eisen-Transportprotein bei Tieren

Lactose-Acetylase Produkt des *lacA*-Gens, das eine unbekannte Funktion im Lactose-Metabolismus hat

Lactose-Permease Protein, das von dem *lacY*-Gen codiert wird und Lactose transportiert

***lacZ*-Gen** Gen, das für die β -Galactosidase codiert; wird häufig als Reportergen benutzt.

large-offspring syndrome Imprinting-Defekt, der eine abnorme Körpergröße zur Folge hat

Latenz Stadium, in dem das Virus sein Genom gleichzeitig mit der Wirtszelle repliziert, ohne Viruspartikel zu produzieren oder die Wirtszelle zu zerstören; ist das gleiche wie Lysogenie, wird aber normalerweise dazu benutzt, um die Situation bei Tierviren zu beschreiben.

LCR (Locuskontrollregion) Regulatorische Sequenz bei Eukaryoten; befindet sich vor einem Gencluster, das sie reguliert.

Lectin Pflanzliches Protein, das spezifisch Kohlenhydrate bindet

leichte Ketten Die kürzeren der beiden Kettenpaare, die das Antikörpermolekül bilden

Leitstrang Neuer DNA-Strang, der während der Replikation kontinuierlich synthetisiert wird

Leptin Ein Proteinhormon, das den Appetit und die Fettverbrennung des Körpers kontrolliert

Leptinrezeptor Rezeptor für Leptin; wird codiert von dem *db*-Gen.

Letalfaktor (LF) Toxinprotein, das von dem Milzbranderreger produziert wird. Es handelt sich um eine Protease, die mehrere Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen (MAPKKs) der Wirtszelle spaltet.

ligieren (in der Biotechnologie) Verknüpfung zweier DNA-Fragmente an ihren Enden unter Verwendung eines Enzyms wie der DNA-Ligase

Lignin Unlösliches Polymer aus quervernetzten aromatischen Resten; kommt in den Zellwänden von Pflanzen vor.

Linker Kurze, doppelsträngige DNA-Segmente mit glatten Enden, die über Erkennungssequenzen für

Restriktionsenzyme verfügen. Sie werden verwendet, um kohäsive Enden an der DNA zu erzeugen.

Lipofektion Nutzung von Liposomen, um DNA oder Proteine in Zielzellen zu transportieren

Liposomen Kugelförmige Vesikel mit einem flüssigen Kern, der von einer Phospholipiddoppelschicht umschlossen ist. Sie können dazu genutzt werden, Oligonucleotide, medizinische Wirkstoffe und andere Moleküle durch Zellmembranen zu transportieren.

***live cell*-Microarray** Methode um siRNA-Bibliotheksklone zu analysieren. Die DNA ist auf einer Glasoberfläche aufgebracht, auf der man dann eukaryotische Zellen wachsen lässt. Die siRNAs werden von den Zellen aufgenommen, und die Zellphänotypen können untersucht werden.

Loch Entsteht, wenn einem Atom ein Elektron fehlt. Wird in Kombination mit Elektronen dazu benutzt, um Strom in einem Halbleiter zu erzeugen.

Locuskontrollregion (LCR) Regulatorische Sequenz bei Eukaryoten; befindet sich vor einem Gencluster, das sie reguliert.

lokale Mediatoren Moleküle, die Signale zwischen benachbarten Zellen übertragen

***long interspersed nuclear elements* (LINEs)** Lange Sequenzen, die in mehrfacher Kopienzahl vorliegen. Sie machen einen erheblichen Teil der mittel-repetitiven DNA von Säugetieren aus.

***long terminal repeats* (LTRs)** Direkte Sequenzwiederholungen von mehreren Hundert Basenpaaren Länge. Sie befinden sich an den Enden von retroviraler RNA und anderen Retroelementen und werden für die Insertion in die Wirts-DNA benötigt.

***loxP*-Stellen** Spezielle Sequenzen, die von der Cre-Rekombinase erkannt werden

***luc*-Gen** Gen, das für die Luciferase bei Eukaryoten codiert

Luciferase Enzym, das mithilfe des Substrats Luciferin Licht emittiert

Luciferin Chemisches Substrat, das von der Luciferase genutzt wird, um Licht zu erzeugen

Lumi-Phos Ein künstliches Substrat, das von der alkalischen Phosphatase gespalten wird. Es entsteht ein instabiles Molekül, das Licht abstrahlt.

Lungenmilzbrand Form des Milzbrands, bei dem die Sporen von *Bacillus anthracis* über die Lunge eindringen; die Todesrate ist hoch.

***lux*-Gen** Gen, das für die Luciferase von Bakterien codiert

- Lysogenie** einer Virusinfektion, bei der das Virus weitgehend ruht. Das Virus repliziert sein Genom gleichzeitig mit der Wirtszelle, ohne Viruspartikel zu produzieren; ist das gleiche wie Latenz, wird aber normalerweise dazu benutzt, um die Situation bei Bakteriophagen zu beschreiben.
- Lysozym** Enzym, das sich in vielen Körperflüssigkeiten findet und das Peptidoglykan der Bakterienzellwand abbaut
- lytische Phase** Phase, in der das Virus viele Viruspartikel produziert und die Zelle zerstört
- M-(Mitose-)Phase** Vierte Phase des eukaryotischen Zellzyklus, in der sich die Zelle teilt; auch bekannt als Mitose.
- Macrolide** Klasse von Antikörpern, die aus dem Polyketidweg stammen
- Magnetosomen** Prokaryotische Organellen, die mineralisierte magnetische Kristalle aus Fe_3O_4 oder Fe_3S_4 , umhüllt von einer Proteinschicht, enthalten
- MalE-Protein** Carrierprotein für Maltose; befindet sich im periplasmatischen Raum bei *E. coli*.
- Maltose-bindendes Protein (MBP)** Protein von *E. coli*, das Maltose während des Transports bindet; wird oft zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet.
- MAO-A-Gen** Gen, das die Monoamin-Oxidase A codiert
- Marathon-Maus** Transgene Maus, die sehr weit laufen kann, bevor sie erschöpft ist
- MAR-Proteine** Proteine, die die Verbindung zwischen den Chromosomen und der Kernmatrix herstellen
- MAT-Locus** Ort auf dem Chromosom der Hefe, der den Kreuzungstyp kontrolliert; er kommt in den Formen *MATa* oder *MAT α* vor.
- Matrixanheftungsregion (MAR)** Ort auf der eukaryotischen DNA, der Proteine der Kernmatrix oder des chromosomalen Gerüsts bindet; das gleiche wie SAR-Stellen
- Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI)** Art der Massenspektrometrie, bei der Gasphase-Ionen unter Verwendung einer festen Matrix und eines Lasers erzeugt werden
- Matrize** DNA-Strang, der als „Leitfaden“ für die Synthese des neuen Strangs dient (durch komplementäre Basenpaarung)
- Mediatorkomplex** Ein Proteinkomplex, der das Signal von Transkriptionsfaktoren an die RNA-Polymerase in eukaryotischen Zellen übermittelt
- Melanocortine** Familie von Peptidhormonen, die alle auf das gleiche Vorläuferprotein zurückgehen, Proopiomelanocortin (POMC)
- Melanocortinrezeptor** Rezeptor für eines von mehreren Hormonen der Familie der Melanocortine
- Metabolom** Sämtliche kleinen Moleküle und Stoffwechselzwischenstufen einer Zelle oder eines gesamten Organismus
- Metabolom-Fingerprinting** Charakterisierung aller Metaboliten, die unter bestimmten Bedingungen zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden sind
- Metagenombibliothek** Bibliothek aus DNA-Sequenzen, die aus einer Umweltprobe isoliert wurden. Beinhaltet die Gensequenzen von vielen verschiedenen Organismen und genetischen Elementen.
- Metagenomik** Untersuchung aller Genome innerhalb einer bestimmten Lebenswelt
- Metalloprotease** Protease, die Proteine mithilfe von Metallionen als Cofaktoren verdaut
- Metallothionein** Ein Metall-bindendes Protein, dessen Synthese nur dann induziert wird, wenn bestimmte Schwermetalle zugegen sind
- Metallothionein-Promotor** Promotor des Gens für Metallothionein; wird in der Gentechnik eingesetzt, weil er sehr stark ist und durch Spuren von Zink und andere Metalle induziert werden kann.
- Metastasierung** Prozess, bei dem Krebszellen eines Primärtumors im Körper umherwandern und Metastasen bilden
- Methioninsulfoximin** Toxisches Analogon von Methionin
- Methotrexat** Antibiotikum, das das Enzym Dihydrofolat-Reduktase in tierischen Zellen inhibiert
- methylcytosinbindendes Protein** Eukaryotisches Protein, das methylierte CG-Regionen erkennt
- Methyl-tert-butylether (MTBE)** Benzinadditiv, das Benzin oxygeniert und als Antiklopffmittel dient. Dieser Zusatz führt zu einer vollständigeren Verbrennung des Kraftstoffs.
- microfluidics** Manipulation von flüssigen Proben im Mikrometermaßstab
- Mighty Mouse** Transgene Maus mit überdurchschnittlicher Muskelentwicklung
- Mikroinjektion** Technik, um fremde DNA in den Zellkern einer Wirtszelle zu transferieren
- MikroRNAs (miRNAs)** Kleine regulatorische RNA-Moleküle in eukaryotischen Zellen
- Mikrosatelliten-Polymorphismus** Genetischer Marker, der aus sehr kurzen Sequenzwiederholungen (zwei bis fünf Basenpaare lang) besteht
- Minigen** Miniaturgen, das einen Teil eines Proteins codiert; wird in der Regel durch künstliche DNA-Synthese hergestellt.
- Minisatelliten** Ein anderer Ausdruck für VNTRs (*variable number tandem repeats*)

Minos Ein Transposon, das ursprünglich bei Insekten gefunden wurde

Minusstrang (-) Der nichtcodierende Strang von DNA oder RNA

Missense-Mutation Mutation, bei der durch Änderung eines Codons eine Aminosäure in einem Protein durch eine andere ausgetauscht wird

mitochondrialer Weg (*mitochondrial death pathway*) Apoptoseprogramm, das die Aktivierung mitochondrialer Proteine beinhaltet, die die Zelle töten; wird oft durch interne Faktoren wie DNA-Schäden ausgelöst.

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) Familie von Signalproteinen, die einen Teil der Phosphorylierungskaskade in tierischen Zellen bilden

mobile DNA DNA-Segment, das sich auf oder zwischen DNA-Molekülen von Ort zu Ort bewegt

mobile Phase Flüssigkeit oder Lösung, die einen Molekülmix enthält und sich bei der Säulenchromatographie über eine stationäre Phase hinweg bewegt

Modifikationsenzyme Enzyme, die dieselbe Sequenz erkennen wie das entsprechende Restriktionsenzym, aber die DNA methylieren

modulares Design Mehrere nützliche Domänen verschiedener Proteine werden zu einem neuen Protein zusammengesetzt.

molarer Extinktionskoeffizient Ist die Absorption einer einmolaren Lösung eines reinen gelösten Stoffes bei gegebener Wellenlänge; je höher er ist, umso mehr Licht wird absorbiert.

molekulare Phylogenetik Untersuchung evolutionärer Beziehungen unter Zuhilfenahme von DNA- oder Proteinsequenzen

molekulares Chaperon Protein, das die korrekte Faltung anderer Proteine überwacht

Molekulargewichtsstandard Mix aus unterschiedlich großen DNA- oder Proteinfragmenten bekannter Größe, um die Größe unbekannter DNA- oder Proteinfragmente zu bestimmen

Monoamin-Oxidase (MAO) Enzym, das am Abbau von Neurotransmittern der Familie der Catecholamine beteiligt ist

monocistronische mRNA mRNA, die die Information eines einzigen Cistrons trägt, das für ein einziges Protein codiert

monoklonaler Antikörper Ein Antikörper mit einer einzigartigen Sequenz, der nur ein spezielles Antigen erkennt; wird von einer Zelllinie produziert, die auf eine einzige B-Zelle zurückgeht.

Morpholino-Antisense-Oligonucleotide Synthetische Oligonucleotide mit Morpholinringen anstelle

von Ribose und Phosphordiamidatbindungen zwischen den Nucleotiden

mRNA (Messenger-RNA) Klasse von RNA-Molekülen, die die genetische Information von den Genen zum Rest der Zelle transportiert

multigenisch Interaktion mehrerer Gene

multi-locus probing (MLP-Methode) Variante des DNA-Fingerprinting, bei der eine Sonde verwendet wird, die an mehreren Stellen im Genom bindet

multiple Klonierungsstelle (MCS) (s. Polylinker) Ein Stück künstlich synthetisierter DNA, das Schnittstellen für sieben oder acht häufig genutzte Restriktionsenzyme enthält

multiple nuclear polyhedrosis virus (MNPV) Ein spezielles Baculovirus, das verbreitet als Klonierungsvektor genutzt wird

Multiplex-PCR Durchführung mehrerer PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primern im gleichen Reaktionsgefäß

murines Leukämievirus (MuLV) Einfaches Retrovirus, das häufig zur Konstruktion von Vektoren für die Gentherapie verwendet wird

Muskeldystrophie Verschiedene Krankheiten, die einen Schwund des Muskelgewebes hervorrufen und vorzeitig zum Tod führen

Mutagenese mit schnellen Neutronen Mutagenesetechnik, bei der Pflanzensamen schnellen Neutronen ausgesetzt werden, die kleinere Deletionen verursachen

Mutation Änderung in der DNA oder RNA, die die genetische Information ausmachen

Mutations-Hotspots Regionen, in denen Mutationen gehäuft auftreten

Mutationszüchtung Verwendung von Mutagenen, um genetische Veränderungen in Pflanzen hervorzurufen und Merkmale zu schaffen oder zu verbessern

Mutatorgen Gen, das Mutationsraten beeinflusst

Mutterkornpilz Pilz, der auf Getreide wächst, speziell auf Roggen. Er produziert ein Gemisch aus Toxinen, die ein als Ergotismus bezeichnetes Syndrom hervorrufen.

Mx-Proteine Antivirale Proteine tierischer Zellen, die RNA-Polymerasen von Minusstrang-RNA-Viren behindern

Myc Ein kleines DNA-Segment, das für ein Peptidopitop codiert, das von Antikörpern erkannt wird. Der Tag wird genutzt, um uncharakterisierte Proteine für eine Analyse zu markieren.

myc-Onkogen Onkogenversion des Gens, das für das Myc-Protein codiert

- Myc-Protein** Transkriptionsfaktor, der für das Anschalten mehrerer an der Zellteilung beteiligter Gene zuständig ist
- Myelomzellen** Krebszellen, die sich von B-Zellen ableiten und deshalb Immunglobulingene exprimieren
- NAD** (Nicotinamadenindinucleotid) Cofaktor, der Reduktionsäquivalente trägt und Dehydrierungsreaktionen katalysiert. NAD ist normalerweise an Abbaureaktionen beteiligt.
- NADP** (Nicotinamadenindinucleotidphosphat) Cofaktor, der Reduktionsäquivalente trägt und Dehydrierungsreaktionen katalysiert. NADP ist normalerweise in Biosynthesewegen aktiv.
- nano** Bedeutet der milliardste Teil (1/1000000000).
- Nanokabel** Kabel mit einem Durchmesser im Nanobereich (10^{-9} Meter). Sie können metallisch sein oder aus halbleitenden Materialien bestehen und als elektrische Leiter dienen. Sie können so konstruiert werden, dass es möglich ist, organische Moleküle wie DNA an ihnen zu befestigen.
- Nanokapseln** Hohle Nanopartikel, die verschiedene Moleküle transportieren können
- Nanopartikel** Partikel mit einer Größe unter einem Mikrometer (100 nm bis 5 nm); sie können in unterschiedlichen Formen konstruiert werden.
- Nanoröhrchen** Zylinder aus reinem Kohlenstoff mit einem Durchmesser zwischen 1 bis 50 nm. Sie haben neue Eigenschaften und kommen für viele nützliche Anwendungen infrage.
- Nanoschichten** Strukturen, die durch viele Nanoröhrchen gebildet werden, die so nebeneinander ausgerichtet sind, dass die Achsen ihrer Zylinder parallel zueinander stehen. Nanoschichten haben die Fähigkeit, Bakterien abzutöten und die Farbe zu verändern.
- Nanostäbchen** Nanopartikel mit einer zylindrischen Form. Nur der Durchmesser muss sich im Nanomaßstab bewegen.
- Naphthalin-Oxygenase** Enzym, das den ersten Schritt beim Abbau von Naphthalin katalysiert, indem es Sauerstoff in den aromatischen Ring einbaut
- Natriumbisulfit** Chemikalie, die Cytosin zu Uracil desaminiert
- Natriumdodecylsulfat (SDS)** Detergens; wird häufig benutzt, um Proteine vor einer Auftrennung durch Elektrophorese zu denaturieren.
- negative Regulation** Art der Regulation, bei der ein Repressor ein Gen so lange ausschaltet, bis er entfernt wird
- negativer Strang (-)** Der nichtcodierende Strang von DNA oder RNA
- Nekrose** Zelltod, der durch Anschwellen und Ruptur der Zelle gekennzeichnet ist; löst eine Immunreaktion aus.
- Neomycin-Phosphotransferase** Enzym, das eine Resistenz gegen Antibiotika wie Neomycin und Kanamycin verleiht
- Nervenwachstumsfaktor** Neurotropher Faktor, der benötigt wird, um Neuronen am Leben zu erhalten
- neuritische Plaques** Aggregate degenerierter Neuronen im Gehirn von Patienten der Alzheimer-Krankheit
- Neurofibrillenbündel** Intrazelluläre Proteinklumpen in Neuronen von Patienten, die an der Alzheimer-Krankheit leiden
- Neuron** Nervenzelle
- Neuropeptid Y (NPY)** Peptid im Gehirn, das den Appetit anregt und Tiere fetter macht
- Neurotoxin** Toxin, das Nervenzellen angreift
- Neurotransmitter** Moleküle, die innerhalb des Nervensystems über Synapsen Signale zwischen Zellen übertragen
- neurotropher Faktor** Lösliches Molekül, das Neuronen und andere Zellen zum Weiterleben stimuliert
- N-Formylmethionin (fMet)** Methioninderivat, das als erste Aminosäure bei der Proteinsynthese der Bakterien verwendet wird
- nichtcodierend (oder antisense)** Der DNA-Strang, der komplementär zur mRNA ist
- Nichtmatrizenstrang** Dieser DNA-Strang ist in seiner Sequenz äquivalent zur der mRNA (identisch mit Plusstrang).
- Nichtnucleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI)** Antivirales Mittel, das die Reverse Transkriptase von Viren wie HIV inhibiert. Es handelt sich hierbei nicht um ein Nucleosidanalogen.
- 3'-nichttranslatierte Region (3'-UTR)** Sequenz am 3'-Ende der mRNA, stromabwärts des letzten Stoppcodons. Sie wird nicht in Protein translatiert.
- 5'-nichttranslatierte Region (5'-UTR)** Region einer mRNA zwischen dem 5'-Ende und dem Translations-Startpunkt
- Nicht-Zielorganismen** Sämtliche Organismen, die unabsichtlich einem speziellen Insektizid, Herbizid oder einer transgenen Pflanze ausgesetzt werden
- nick** Ein Bruch im Rückgrat eines DNA- oder RNA-Moleküls (ohne Basenverlust)

Nicotin Alkaloid im Tabak, das das Level an UCP1 im braunen Fettgewebe erhöht und den Fettstoffwechsel fördert

Nitrocellulose Eine baumwollartige Substanz; wird beim Western Blotting dazu benutzt, Proteine zu binden.

Nomarski-Interferenzkontrastmikroskop (s. Differenzial-Interferenzkontrastmikroskop) Spezielle Mikroskopietechnik, die Dichteunterschiede in Kontrastunterschiede verwandelt; dies ergibt ein plastisches Bild, das wie ein dreidimensionales Relief wirkt.

Nonsense-Mutation Mutation infolge einer Änderung eines Codons für eine Aminosäure in ein Stoppcodon

Noradrenalin Neurotransmitter aus der Familie der Catecholamine (auch bekannt als Norepinephrin)

Norepinephrin Neurotransmitter aus der Familie der Catecholamine (auch bekannt als Noradrenalin)

Northern-Blot Hybridisierungstechnik, bei der eine DNA-Sonde an ein RNA-Zielmolekül bindet

nosokomiale Infektionen Infektionen, die sich stationär behandelte Patienten im Krankenhaus zuziehen

NO-Synthetase Enzym, das Stickstoffmonoxid synthetisiert

npt Gen, das für die Neomycin-Phosphotransferase codiert

Nucleocapsid Innere Struktur eines bestimmten Virus; besteht aus RNA oder DNA, umgeben von Protein.

Nucleosidanalogen Molekül, das ein Nucleosid gut genug nachahmt, um mithilfe synthetischer Enzyme in eine wachsende DNA-Kette eingebaut zu werden

Nucleosom Teil des eukaryotischen Chromosoms; besteht aus DNA, welche um Histonproteine gewunden ist.

Nucleotid Untereinheit der Nucleinsäuren; besteht aus einem Pentosezucker, einer Base und einer Phosphatgruppe.

nullizygot Wenn beide Kopien eines Gens komplett inaktiviert sind

ob-Gen (*obese*-Gen) Gen, das für das Proteinormon Leptin codiert

Ödemfaktor (EF) Toxinprotein des Milzbranderreger; fungiert als Adenylat-Cyclase.

offenes Leseraster (ORF) Basensequenz (entweder DNA oder RNA), die – zumindest theoretisch – in Protein translatiert werden kann

Okazaki-Fragmente Kurze DNA-Stücke aus denen der Folgestrang hergestellt wird

Oligonucleotide Moleküle, die aus 25 oder weniger Nucleotiden bestehen. Sie werden als Primer bei *in vitro*-DNA-Replikation, Sequenzierung oder PCR-Reaktionen eingesetzt.

Onkogen Mutiertes Gen, das Krebs fördert

onkogenes Virus Virus, das Krebs auslöst

onkolytische Viren Krebszerstörende Viren

Oocyte Weibliche Eizelle

Operator DNA-Bereich, an den ein Repressorprotein bindet

Operon Cluster prokaryotischer Gene, die gemeinsam transkribiert werden, um eine einzige mRNA zu bilden (d.h. eine polycistronische mRNA)

opportunistische Infektion Infektion, die bei Patienten mit einem defekten Immunsystem vorkommt, verursacht von normalerweise harmlosen Mikroorganismen

orale Impfstoffe Impfstoffe, die als Tabletten, Kapseln oder in flüssiger Form über den Mund aufgenommen werden

oriC Replikationsursprung bei *E. coli*

Orthomyxoviren Familie von einzelsträngigen Minusstrang-RNA-Viren, zu denen das Influenzavirus gehört

overlap-PCR PCR-Technik, die sich überlappende Primer bedient, um kurze Regionen zweier verschiedener Gensegmente (aus verschiedenen Quellen) zusammenzufügen

Oxygenase Enzym, das ein oder mehrere Sauerstoffatome in ein Substrat einfügt

p21-Protein Ein Protein, das die Zellteilung blockiert, indem es an Cycline bindet und diese deaktiviert

p53-Gen Ein berühmtes Antionkogen, das in Krebszellen oft mutiert ist

p53-Protein (auch als TP53 bekannt) Ein DNA-bindendes Protein, das von dem p53-Gen codiert wird und die Zellteilung stoppt. Zellen mit Mutationen im p53-Gen teilen sich weiter und replizieren sich länger als normal.

Papillomviren Familie kleiner DNA-Viren, die manchmal Krebs auslösen

Pathogenitätsinsel Region auf dem bakteriellen Chromosom, die von gegenläufigen Sequenzwiederholungen flankiert ist; sie trägt viele Gene, die an der Virulenz und Pathogenität beteiligt sind.

P-Element Transposon von *Drosophila* und anderen Insekten

Penicilline Unterfamilie der β -Lactam-Antibiotika

- Penicillium notatum** Der Schimmelpilz, der Penicillin produziert
- Penton** Proteinuntereinheit des Viruscapsids mit einer Fünffach-Symmetrie. An jedem Eckpunkt treffen jeweils fünf benachbarte Untereinheiten aufeinander.
- Pentose** Zucker aus fünf Kohlenstoffatomen wie Ribose oder Desoxyribose
- Peptidase** Das gleiche wie Proteinase; Enzym, das Polypeptide hydrolysiert
- Peptidimpfstoffe** Impfstoffe, die ein kurzes Epitop oder Peptid gebunden an ein Carrierprotein tragen. Das Immunsystem produziert Antikörper gegen das Peptid und erwirbt Immunität gegen den Krankheitserreger.
- Peptidnucleinsäure (PNA)** Künstliches Nucleinsäureanalogon mit einem Polypeptidrückgrat
- Peptidyltransferase** Enzymaktivität auf dem Ribosom, die Peptidbindungen knüpft; eigentlich die 23S-rRNA (Bakterien) oder 28S-rRNA (Eukaryoten)
- PEST-Sequenz** Region, die aus zehn bis 60 Aminosäuren besteht, reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) ist und von Proteasen erkannt wird
- Phage** Kurzform für Bakteriophage, ein Virus, das Bakterien infiziert
- Phagen-Display** Fusion eines Proteins oder Peptids mit dem Hüllprotein eines Bakteriophagen, dessen Genom ebenfalls das klonierte Gen enthält, das für das Protein codiert. Das Protein wird auf der Außenseite des Viruspartikels präsentiert und das korrespondierende Gen nach innen transportiert.
- Phänotypkatalog** Eine Aufstellung von Proteinen, die nach Zerstörung ihrer Funktion den gleichen Phänotyp verursachen
- Phänotypsignatur** Eine Zusammenstellung physischer Charakteristika, die zusammen eine spezielle Zellfunktion klassifizieren wie Adhärenz, Beweglichkeit oder Zellteilung
- Pharmakogenetik** Untersucht die genetisch bedingten unterschiedlichen Reaktionen (sowie Unterschiede im Metabolismus) von Menschen auf Arzneimittel.
- Pharmakogenomik** Erforschung der Gene, die im Zusammenhang mit dem Arzneimittel-Metabolismus und der Reaktion auf Arzneimittel stehen
- Phasenvariation** Reversible Inversion eines DNA-Segments, die zu einer unterschiedlichen Genexpression führt
- Phenol** Organisch-chemisches Molekül mit der Formel C_6H_5OH ; besteht aus einer Hydroxylgruppe, die mit einem Phenylring verknüpft ist. Es wird benutzt, um Proteine durch Abscheidung von Nucleinsäuren zu trennen.
- Phenylalanin-Hydrolase** Enzym, das die Aminosäure Phenylalanin in Tyrosin umwandelt
- Phenylboronat** Harz, das β -Lactamasen bindet
- Phenylketonurie** Erblicher Defekt, der ein Fehlen des Enzyms Phenylalanin-Hydroxylase verursacht und zu einer Anreicherung von Phenylalanin führt
- Pheromon** Molekül, das Signale zwischen Organismen überträgt
- phoA-Gen** Gen, das für die Alkalische Phosphatase codiert; wird oft als Reportergen eingesetzt.
- Phosphatgruppe** Gruppe von vier Sauerstoffatomen, die um ein zentrales Phosphoratom gruppiert sind; Bestandteil des DNA- und RNA-Rückgrats
- Phosphodiesterase 5 (PDE-5)** Eine spezielle zyklische Phosphodiesterase in tierischen Zellen, die cGMP abbaut
- Phosphodiesterbindung** Die Bindung zwischen Nucleotiden in einer Nucleinsäure besteht aus einer zentralen Phosphatgruppe, die beidseitig mit den Hydroxylgruppen der Zucker verestert ist.
- Phospholipase** Enzym, das Phospholipide abbaut
- Phosphordiamidat** Ungeladene Version einer Phosphodiesterbindung, die Nucleotide verbindet; eines der Sauerstoffatome ist durch eine Amidat-Gruppe ersetzt.
- Phosphorelay** Begriff, der den Transfer eines Phosphats von einer Position zur nächsten beschreibt, um sukzessive verschiedene Proteine zu aktivieren
- Phosphorthioat** Eine Phosphatgruppe, bei der eines der vier Sauerstoffatome, die das zentrale Phosphat umgeben, durch Schwefel ersetzt ist
- Phosphorthioat-Oligonucleotid** Synthetisches Oligonucleotid, bei dem eines der vier Sauerstoffatome der Phosphodiesterbindung zwischen den Nucleotiden durch Schwefel ersetzt ist
- Phosphotransferasesystem** System, das in vielen Bakterien vorkommt und Zucker transportiert sowie den Stoffwechsel reguliert. Es arbeitet, indem es Phosphatgruppen überträgt.
- Photodetektor** Empfindliches Instrument, das optische Signale detektiert und diese in elektrische Signale konvertiert
- Photolithographie** Methode, um Oligonucleotide direkt auf einem DNA-Chip zu synthetisieren, wobei Licht durch eine Maske geleitet wird, um selektiv bestimmte Regionen zu aktivieren und andere zu blockieren

Photolyase Enzym, das als Reaktion auf blaues Licht die Reparatur von Thymindimeren katalysiert

phylogenetischer Baum Diagramm, das die evolutionären Beziehungen zwischen verschiedenen Organismen darstellt

physikalische Karten Karten, die die Distanz zwischen zwei Merkmalen in Basenpaaren angeben

Picornaviren Virusfamilie, zu der die Enteroviren (z.B. das Poliovirus) und die Rhinoviren (die den grippalen Infekt hervorrufen) gehören

piezoelektrische Keramik Material, das seine Form als Reaktion auf eine angelegte Spannung verändert

piggyBac Transposon, das man ursprünglich in Insekten gefunden hat

Pilin Protein, das den Hauptteil des Pilus ausmacht

Pilus (Plural **Pili**) Dünne, helikale Proteinfilamente, die sich auf der Oberfläche von Bakterien befinden (identisch mit Fimbrie)

Plaques (bei Viren) Eine klare Zone, wo eine Schicht von Kulturzellen bzw. ein Bakterienrasen durch Virusbefall zerstört wurde

2- μ m-Plasmid Kleines Plasmid, das in vielen Kopien in *Saccharomyces cerevisiae* vorkommt. Es wird in verschiedenen Varianten häufig als Vektor eingesetzt.

Plasmide Selbstreplizierende genetische Elemente, die in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen manchmal vorkommen. Sie sind keine Chromosomen und kein Bestandteil des dauerhaften Genoms. Die meisten Plasmide sind zirkuläre doppelsträngige DNA-Moleküle, obwohl auch selten lineare oder RNA-Plasmide vorkommen.

Plasmidinkompatibilität Die Unfähigkeit zweier Plasmide der gleichen Familie, in derselben Wirtszelle zu coexistieren

Plasmodium falciparum Protozoischer Parasit, der die maligne Form der Malaria verursacht

Plusstrang (+) Der codierende Strang von DNA oder RNA

Pockenviren Familie von großen Tierviren mit dsDNA und ungefähr 150 bis 200 Genen

poison sequence Basensequenz, die oft in Virusgenomen vorkommt; bleibt in den Plasmiden der bakteriellen Wirte nicht stabil erhalten oder wird nicht stabil repliziert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) Technik, um Proteine durch Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel zu trennen

Polyadenylierungskomplex Proteinkomplex, der den Poly(A)-Schwanz an die eukaryotische mRNA anhängt

Poly(A)-Schwanz Eine Reihe von Adenosinresten, die sich am 3'-Ende der mRNA befinden

polycistronische mRNA mRNA, die mehrere codierende Sequenzen trägt (Cistrons), die – wenn sie translatiert werden – verschiedene Proteinkomplexe ergeben; kommt nur in prokaryotischen (bakteriellen) Zellen vor.

Polyeder (in Bezug auf Viren) Pakete aus Viruspartikeln, die in eine Proteinmatrix eingebettet sind, die von Baculoviren gebildet wird

Polyglutaminbereich Eine Reihe von Glutamineinheiten in einem Protein

Polyhedrin Protein, das die polyedrische Struktur von Baculoviren enthält

Polyhistidin-Tag (His6-Tag) Sechs aufeinanderfolgende Histidinreste, die mit Proteinen fusioniert sind. Eine Proteinreinigung ist durch Bindung an Nickelionen möglich, die an eine Säule gebunden sind.

Polyhydroxyalkanoat (PHA) Eine Art von Kunststoff, der von bestimmten Bakterien aus Hydroxysäureuntereinheiten hergestellt wird

Polyhydroxybutyrat (PHB) Kunststoff, der von bestimmten Bakterien aus Hydroxybutyratuntereinheiten hergestellt wird

Polyketide Klasse natürlicher, linearer Polymere, deren Rückgrat sich aus wiederholenden Unter-einheiten zusammensetzt, die aus zwei Kohlenstoffatomen bestehen; bei der Synthese trägt jedes zweite Kohlenstoffatom eine Ketogruppe.

polyklonaler Antikörper Natürlicher Antikörper, der eigentlich aus einem Gemisch verschiedener Antikörperproteine besteht, die alle das gleiche Antigen binden

Polylinker (s. **multiple Klonierungsstelle, MCS**) Ein Stück künstlich synthetisierter DNA, die Schnittstellen für sieben oder acht häufig genutzte Restriktionsenzyme enthält

Polymerasekettenreaktion (PCR) Amplifizierung von DNA-Sequenzen durch wiederholte Zyklen von Strangtrennung und Replikation

polyploid Mehrere Chromosomensets pro Zelle

Polysom Gruppe von Ribosomen, die an dieselbe mRNA binden und diese translatieren

polytäre Chromosomen Gigantische Chromosomen, die in Zellen vorkommen, die ihre DNA replizieren, sich aber nicht teilen. Sind in Speicheldrüsenzellen von *Drosophila* zu finden.

polyvalenter Inhibitor Inhibitor, der aus verschiedenen verknüpften Inhibitormolekülen besteht und mehrere Zielproteine bindet, was zu einer enorm erhöhten Bindungsaffinität insgesamt führt

- Positionseffekt-Variation** Der Effekt der chromosomalen Position auf die Expression eines bestimmten Gens. Gene, die innerhalb von Heterochromatin liegen, werden beispielsweise nicht exprimiert; befinden sie sich jedoch im Euchromatin, werden sie exprimiert.
- Positionsklonierung** Ein Ansatz, bei dem die Position eines Gens bestimmt wird, indem man mithilfe einer genetischen Methode eine Kartierung durchführt; wird benutzt, wenn die Natur des Genprodukts unbekannt ist.
- positive Regulation** Kontrolle durch einen Aktivator, der durch Bindung die Genexpression fördert
- positiver Strang (+)** Der codierende Strang von RNA oder DNA
- posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS)** Pflanzliche Variante der RNA-Interferenz
- Prader-Willi-Syndrom** Erblicher Defekt, der durch einen Funktionsverlust von Genen auf der väterlichen Kopie des Chromosoms 15 verursacht wird, die der genetischen Prägung unterliegen
- Prä-MikroRNAs** Lange Vorläufermoleküle, die in MikroRNAs umgewandelt werden
- Prä-Proinsulin** Insulin direkt nach seiner Synthese, das zunächst sowohl eine Signalsequenz als auch das verbindende C-Peptid besitzt
- Präseniline** Transmembranproteine des Golgi-Apparats und des endoplasmatischen Reticulums; stehen mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung.
- pRB (Retinoblastomprotein)** Protein, das mit einer Krebsform der Retina des Auges assoziiert ist; involviert in die zelluläre Seneszenz.
- PriA** Protein des Primosoms, das der Primase hilft, zu binden
- primärer Antikörper** Erster Antikörper, der das interessierende Protein erkennt; wird in Western Blots dazu verwendet, um ein Protein zu identifizieren.
- Primärtranskript** RNA-Molekül, das nach Transkription der DNA-Matrize entsteht, vor jeglicher Prozessierung oder Modifikation
- Primase** Enzym, das den Beginn der Synthese eines neuen DNA-Stranges ermöglicht, indem es einen RNA-Primer herstellt
- Prion-Protein (PrP)** Protein des Gehirns, das möglicherweise in zwei Formen vorkommt; eine davon ist pathogen und ist eventuell die Ursache für die Transmissible Spongiforme Enzephalopathie.
- Prnp-Gen** Gen, das für das Prion-Protein codiert
- Prodrug** Eine harmlose Verbindung, die von einem spezifischen Enzym in einen aktiven Wirkstoff umgewandelt werden kann
- programmierter Zelltod** Genetisches Programm, das geschädigte Zellen oder solche, die nicht mehr benötigt werden, eliminiert, ohne das Immunsystem zu aktivieren
- Proinsulin** Vorläufer des Insulins, der A- und B-Ketten sowie das verbindende Peptid enthält
- Promotor** Vor dem Gen gelegene DNA-Region, die die RNA-Polymerase bindet und so die Genexpression ermöglicht
- Pronuclei** Die elterlichen männlichen und weiblichen Zellkerne in einer befruchteten Eizelle (direkt vor der Verschmelzung)
- Prophage** Bakteriophagen genom, das in die DNA der bakteriellen Wirtszelle integriert wurde
- Protease** Das gleiche wie Proteinase; ein Enzym, das Polypeptide durch Hydrolyse abbaut
- Proteaseinhibitor** Inhibitor von Protease-Enzymen, beispielsweise ein antiviraler Wirkstoff, der gegen die Protease von HIV gerichtet ist
- Protein A** Ein Antikörper-bindendes Protein von *Staphylococcus*, das oft zur Herstellung von Fusionsproteinen genutzt wird
- protein misfolding cyclic amplification (PMCA-Technik)** Methode, die Prionen mit abnormer Konformation analog zur PCR-Technik amplifiziert
- Protein** Polymer, das aus Aminosäuren besteht; setzt sich möglicherweise aus mehreren Polypeptidketten zusammen.
- Proteinase** Das gleiche wie Protease; ein Enzym, das Polypeptide durch Hydrolyse abbaut
- Protein-Engineering** Veränderung der Sequenz eines Proteins, indem man die DNA – die für das Protein codiert – modifiziert
- Proteinfusion** Hybridprotein, das durch die Verknüpfung der codierenden DNA-Sequenzen zweier Proteine „in frame“ hergestellt wurde
- Protein-Fusionsvektor** Vektor, der klonierte Proteine mit einem Carrierprotein fusioniert, um die Expression und/oder den Export zu unterstützen
- Protein-Interaktom** Die Gesamtheit aller Protein-Protein-Interaktionen innerhalb einer Zelle oder eines Organismus
- Proteinkinase** Enzym, das Phosphatgruppen auf andere Proteine überträgt, um so deren Aktivität zu kontrollieren
- Proteinkinase A (PKA)** Eine spezielle Proteinkinase tierischer Zellen, die durch cAMP aktiviert wird
- protektives Antigen (PA)** Protein, das als Zustellungssystem für beide Toxinproteine des Milzbranderreger fungiert
- Proteom** Die Gesamtheit an Proteinen, codiert von einem Genom bzw. Organismus

- Proteomik** Analyse der kompletten Proteinausstattung eines Organismus
- Protoonkogen** Das ursprüngliche, nichtmutierte Wildtypallel eines Onkogens
- Protoplasten** Dissoziierte Pflanzenzellen, deren Zellwände aufgelöst wurden
- Provirus** Virusgenom, das in die DNA der Wirtszelle integriert wurde
- PrP^C** Normale, zelluläre Form des Prion-Proteins
- PrP^{Sc}** Pathogene Form des Prion-Proteins („Scrapie“)
- Pseudogen** Defekte Kopie eines echten Gens
- Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)** Variante der Gelelektrophorese, die dazu eingesetzt wird, sehr große DNA-Moleküle zu analysieren. Man nutzt ein „pulsierendes“ elektrisches Feld, das von hexagonal angeordneten Elektroden erzeugt wird.
- PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*)** Ein Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie, der Bax aktiviert und die Apoptose fördert
- Purin** Stickstoffhaltige Base, bestehend aus einem doppelten Ring, die Bestandteil von DNA und RNA ist
- Pyrimidin** Stickstoffhaltige Base, bestehend aus einem einzelnen Ring, die Bestandteil von DNA und RNA ist
- Quantenausbeute** Der Quotient aus absorbierten Photonen und den während der Fluoreszenz emittierten Photonen
- Quanteneinschluss** Phänomen, das bei Strukturen im Nanomaßstab auftritt, wo ein Elektron-Loch-Paar sich in einer Struktur befindet, die nahe ihrem natürlichen Bohr-Radius ist. Die verschiedenen Energiezustände sind nicht kontinuierlich.
- Quasispezies** Gruppe verwandter RNA-Genome, die sich geringfügig in ihrer Sequenz unterscheiden, aber aus dem gleichen parentalen RNA-Molekül entstanden sind
- quelling** RNA-Interferenz bei Pilzen
- Radiation-hybrid-mapping** Kartierungstechnik, die Zellen benutzt (normalerweise von einem Nagetier), welche Chromosomenfragmente (erzeugt durch Bestrahlung) von einer anderen Spezies enthalten
- Radikalsubstitution** Ersetzen einer Aminosäure durch eine andere, die abweichende chemische und physikalische Eigenschaften hat
- radiochemischer Detektor** Gerät, das radioaktiv markierte Moleküle detektiert, beispielsweise in der mobilen Phase einer Chromatographie
- random shuffling library** Bibliothek von Gen- oder Proteinsequenzen, die durch zufälliges Mischen und Verknüpfen kleiner Segmente hergestellt wird
- ras-Onkogen** Onkogene Version des Gens, das für das Ras-Protein codiert
- Ras-Protein** GTP-bindendes Protein, das an der Signalübermittlung im Rahmen der Zellteilung bei Tieren beteiligt ist
- Rasterkraftmikroskop (RKM)** Ein Instrument, das Oberflächen im molekularen Maßstab darstellen kann, indem es die Oberflächenkonturen abtastet
- Raster-Scan** Eine Sonde wird in einem vorgegebenen Raster über eine Oberfläche geführt; die Darstellung der Daten erfolgt als gerastertes Bild.
- Rastertunnelmikroskop (RTM)** Ein Instrument, das in der Lage ist, leitende Oberflächen auf atomarer Ebene darzustellen; wurde dazu benutzt, Moleküle auf einer Oberfläche zu befestigen.
- rBST** Rekombinantes bovines Somatotropin
- reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROM)** Vom Sauerstoff abgeleitete, hoch reaktive Moleküle bzw. Ionen mit zusätzlichen Elektronen (beispielsweise Superoxidionen, Peroxide, Hydroxylradikale)
- reanneal** Renaturierung von einzelsträngiger DNA zu doppelsträngiger DNA
- rechtsgängige Helix** Wenn ein Betrachter bei einer rechtsgängigen Helix die Achse hinunter schaut (in beide Richtungen), windet sich jeder Strang im Uhrzeigersinn um die zentrale Achse.
- rekombinante Plasmide** Plasmide, die ein DNA-Segment enthalten, das ursprünglich nicht zu dem Plasmid gehört; es stammt in der Regel von einem anderen Organismus.
- rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator (rt-PA)** Gewebespezifischer Plasminogenaktivator, der in einem anderen Organismus produziert wird
- rekombinantes bovines Somatotropin (rBST)** Bovines Wachstumshormon, das in einem anderen Organismus produziert wird
- rekombinantes humanes Somatotropin (rHST)** Menschliches Wachstumshormon, das in einem anderen Organismus produziert wird
- rekombinantes Protein** Protein, das von einem rekombinanten DNA-Gen exprimiert wird
- Rekombinase** Enzym, das die Rekombination zwischen invertierten Sequenzwiederholungen katalysiert
- Replikationsgabel** Region, in der die Enzyme, die das DNA-Molekül replizieren, an die unverdrillte, einzelsträngige DNA binden

- Replikationsursprung** Stelle auf einem Chromosom oder einem anderen DNA-Molekül, an der die Replikation beginnt
- replikative Form (RF)** Doppelsträngige Form des Genoms eines einzelsträngigen DNA- oder RNA-Virus. Die RF repliziert sich zuerst selbst und wird dann dazu genutzt, ssDNA (oder ssRNA) zu generieren, die in Viruspartikel verpackt wird.
- replikative Seneszenz (zelluläre Seneszenz)** Gestoppte Zellteilung bei kultivierten Säugetierzellen
- replikative Transposition** Art von Transposition, bei der zwei Kopien des Transposons gebildet werden, eine an der ursprünglichen Stelle, die andere an einer neuen Stelle
- replikatives Altern** Bezieht sich auf die Anzahl der Tochterzellen, die eine Hefezelle im Laufe ihres Lebens hervorbringen kann.
- Replikator** Ein System, das Kopien seiner selbst herstellen kann, wenn Energie und Ausgangsmaterialien bereitgestellt werden
- Replikon** DNA- oder RNA-Molekül, das einen Replikationsursprung besitzt und sich selbst replizieren kann
- Replisom** Komplex aus Proteinen (wie Primase, DNA-Polymerase, Helikase, SSB-Protein), der die DNA repliziert
- Repressor** Regulatorisches Enzym, das die Transkription eines Gens verhindert
- Restriktionsendonuclease** Endonuclease, die doppelsträngige DNA an einer bestimmten Basensequenz schneidet – der Erkennungsstelle
- Restriktionsenzym** Endonuclease, die doppelsträngige DNA an einer bestimmten Basensequenz schneidet – der Erkennungsstelle
- restriktionsenzymgenerierte siRNA (REGS)** Methode zur Erstellung einer RNAi-Bibliothek, die mithilfe von Restriktionsenzymen zufällige doppelsträngige Gensegmente, mit einer Länge zwischen 21 und 23 Nucleotiden, erzeugt
- Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs)** Unterschiedliche Restriktionsschnittstellen bei zwei verwandten DNA-Molekülen führen zu Restriktionsfragmenten unterschiedlicher Länge.
- Retina-Scan** Scan des einzigartigen Musters der Blutgefäße der Netzhaut
- Retinoblastomgen (Rb-Gen)** Antionkogen, das für eine seltene Krebsform der Retina des Auges verantwortlich ist
- Retinoblastomprotein (pRB)** Protein, das mit einer Krebsform der Retina des Auges assoziiert ist; involviert in die zelluläre Seneszenz
- Retroviren** Familie von Tierviren mit einer einzelsträngigen RNA, umgeben von einer Proteinhülle und einer äußeren Membran. Sobald sich das Virus in einer Wirtszelle befindet, wandelt es sein RNA-Genom mithilfe der Reversen Transkriptase in eine DNA-Kopie um.
- reverse Impfstoffentwicklung** Ein Ansatz zur Entwicklung neuer Impfstoffe, der sich der Genomik bedient, um neue Epitope oder Proteine von Krankheitserregern zu identifizieren, die hoch antigen sind, aber keine Krankheiten auslösen
- Reverse Transkriptase** Enzym, das einzelsträngige RNA als Matrize benutzt, um doppelsträngige DNA zu erzeugen
- Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)** PCR-Variante, mit deren Hilfe Gene als Intron-freie DNA-Kopien amplifiziert und kloniert werden können, ausgehend von mRNA und unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase
- Rezeptor** Molekül, das ein weiteres Molekül wie ein Hormon oder einen Nährstoff bindet. Rezeptoren sind häufig Proteine, die an der Signalübermittlung beteiligt und an der Außenseite von Zellen lokalisiert sind.
- RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)** Unterschiedliche Restriktionsschnittstellen bei zwei verwandten DNA-Molekülen führen zu Restriktionsfragmenten unterschiedlicher Länge.
- Rhinoviren** Gruppe kleiner RNA-Viren, die für einen großen Teil der grippalen Infekte verantwortlich ist
- ρ -(rho-)Protein** Faktor, der für die erfolgreiche Termination an speziellen Transkriptionsterminatoren erforderlich ist
- rHST** Rekombinantes humanes Somatotropin
- Ribonuclease (RNase)** Enzym, das RNA schneidet oder abbaut
- Ribonucleoprotein** Protein, das mit RNA assoziiert ist
- Riboschalter** (bei der Attenuation) Riboschaltertyp, der aufgrund eines Signals eine vorzeitige Termination auslöst, indem er beispielsweise eine Schleifenstruktur in die mRNA einführt
- Riboschalter** Domänen der mRNA, die direkt auf ein Signal reagieren und die Translation kontrollieren, indem sie zwischen zwei verschiedenen RNA-Sekundärstrukturen wechseln
- Ribose** Zucker mit fünf C-Atomen, der Bestandteil der RNA ist
- Ribosom** Zellmaschinerie zur Herstellung von Proteinen

ribosomale RNA (rRNA) Klasse von RNA-Molekülen, die einen Teil der Struktur eines Ribosoms ausmachen

Ribosomenbindungsstelle Sequenz, die sich nahe des Anfangs der mRNA befindet und von dem Ribosom erkannt wird; kommt nur in prokaryotischen Zellen vor.

Ribosomen-inaktivierendes Protein (RIP) Toxisches Protein, das Ribosomen inaktiviert, indem es Adenin an einer bestimmten Stelle der ribosomalen RNA der großen Untereinheit freisetzt

Ribotyping Identifizierung von Bakterien oder anderen lebenden Organismen, basierend auf der Sequenz der *small-subunit ribosomal RNA*

Ribozym RNA-Molekül, das als Enzym wirkt

Ricin Stark toxisches Ribosomen-inaktivierendes Protein des Wunderbaumes

Rinderwahnsinn Eine degenerative Erkrankung des Gehirns von Rindern, verursacht von Prionen; auch bekannt als Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE).

RNA (Ribonucleinsäure) Nucleinsäure, die im Gegensatz zur DNA eine Ribose anstelle einer Desoxyribose besitzt

RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) RNA-Polymerase, die RNA als Matrize benutzt; sie ist an der Verstärkung der RNAi-Antwort beteiligt.

RNAi-Bibliothek Eine Bibliothek, die doppelsträngige RNA exprimiert, um RNA-Interferenz zu aktivieren. Jeder Klon der Bibliothek inaktiviert ein Gen des interessierenden Organismus.

RNA-induzierter Silencingkomplex (RISC) Proteinkomplex, der durch siRNA induziert wird. Er baut einzelsträngige RNA ab, die in ihrer Sequenz mit der siRNA korrespondiert.

RNA-Interferenz (RNAi) Antwort, die durch doppelsträngige RNA-Moleküle ausgelöst wird. Diese hat einen Abbau von mRNA und anderer RNA-Transkripte, die zur induzierenden dsRNA homolog sind, zur Folge.

RNA-Polymerase Enzym, das RNA synthetisiert

RNA-Polymerase I Eukaryotische RNA-Polymerase, die die Gene für die RNA der großen ribosomalen Untereinheit transkribiert

RNA-Polymerase II Eukaryotische RNA-Polymerase, die die Gene transkribiert, welche für Proteine codieren

RNA-Polymerase III Eukaryotische RNA-Polymerase, die die Gene für die 5S-rRNA und die Transfer-RNA transkribiert

RNA-SELEX Methode, bei der katalytisch aktive RNA-Sequenzen durch Mutationen modifiziert

werden, um neue Liganden oder Substrate für ihre Aktivität zu identifizieren

RNA-SIP Methode, die darauf abzielt, RNA aus einer Umweltprobe anzureichern. Ein stabiles Isotop wird mit einer Umweltprobe vermischt und inkorporiert in jede Lebensform, die RNA zur Protein-Expression benutzt.

rolling circle-Replikation Mechanismus zur Replikation doppelsträngiger, zirkulärer DNA. Der Prozess beginnt mit dem Spalten und Abrollen eines Stranges. Der andere, zirkuläre Strang wird als Matrize für die DNA-Synthese genutzt. Kommt bei einigen Plasmiden und Viren vor.

ROM (reaktive Sauerstoffmetaboliten) Vom Sauerstoff abgeleitete, hoch reaktive Moleküle bzw. Ionen mit zusätzlichen Elektronen (beispielsweise Superoxidionen, Peroxide, Hydroxylradikale)

rosy-Gen Gen von *Drosophila*, das die Augenfarbe beeinflusst

Rous-Sarkom-Virus (RSV) Krebsauslösendes Retrovirus bei Hühnern

rt-PA Rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator

RU486 Progesteron-Antagonist; ein aktiver Bestandteil der Abtreibungspille

Rückkreuzung Prozedur, bei der eine der Elternpflanzen mit dem Pollen eines Nachkommen bestäubt wird

RXR-Protein Kernprotein, das gemischte Dimere mit Rezeptoren für Androgene, Vitamin D, Thyroxin und Retinsäure bildet

Sarkom Krebs, der aus Muskelzellen hervorgeht

Satellitenvirus Defektes Virus, das ein nicht-verwandtes Helfervirus benötigt, welches die fehlenden Komponenten bereitstellt, um die Wirtszelle zu infizieren

schmelzen Trennung eines DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge durch Erhitzen

Schmelztemperatur, T_m Die Temperatur, bei der 50 % des Proteins denaturiert vorliegen

schnelle Neutronen Freie Neutronen mit einer kinetischen Energie von nahe 1 MeV, die genutzt werden, um DNA-Deletionen in Pflanzensamen zu verursachen

Schwarzer Tod Pestepidemie Mitte des 13. Jahrhunderts

schwere Ketten Die längeren der beiden Kettenpaare, die das Antikörpermolekül bilden

SCID (*severe combined immunodeficiency*) Immundefekt, der auftritt, wenn sowohl B-Zellen als auch T-Zellen des Immunsystems defekt sind. Bei etwa

25 % der vererbten SCID-Fälle ist ein Mangel an Adenosin-Desaminase die Ursache.

scrape-loading Methode, um Oligonucleotide in Kulturzellen zu bringen, indem man die Zellen vorsichtig von der Petrischale kratzt. Das Kratzen verursacht kleine Brüche in der Zellmembran, die es den Oligonucleotiden erlauben, in das Cytoplasma zu gelangen.

Scrapie Degeneration des Gehirns bei Schafen und Ziegen, verursacht von Prionen

sekundärer Antikörper Antikörper, der an den primären Antikörper bindet; er besitzt ein Detektionssystem. Wird beim Western Blot eingesetzt, um ein interessierendes Protein zu identifizieren.

sekundärer Bote Ein intrazelluläres Signalmolekül wird gebildet, wenn ein Rezeptor auf der Oberfläche von Zellen ein Signal erhält.

SELDI-Massenspektrometrie Form der Massenspektrometrie, bei der sich das interessierende Protein in der flüssigen Phase befindet (platziert auf einer festen Oberfläche) und mithilfe eines Lasers ionisiert wird

selektiver Druck (in der Datenanalyse) Ausüben eines kontinuierlichen selektiven Drucks sowie Verfeinerung eines speziellen Datensatzes, basierend auf festgelegten Kriterien

semikonservative Replikation Art der DNA-Replikation, bei der jedes Tochtermolekül einen Strang des Ausgangsmoleküls und einen neu synthetisierten Strang erhält

Sense-Strang DNA-Strang, der in seiner Sequenz äquivalent zur mRNA ist (identisch mit Plusstrang)

Sensorkinase Protein, das sich selbst phosphoryliert, wenn es ein spezifisches Signal wahrnimmt (oft ein Stimulus aus der Umgebung, manchmal ein internes Signal)

sequence tagged site (STS) Kurze Sequenz (gewöhnlich 100–500 bp), die einzigartig innerhalb des Genoms ist und leicht detektiert werden kann – normalerweise durch PCR

Sequenzalignment Aneinander ausrichten von DNA-Sequenzen nach den Regionen mit der größten Ähnlichkeit. Auf diese Weise können zwei oder mehr Gene miteinander verglichen werden.

Serinprotease Protease mit einem Serin im aktiven Zentrum

Serin-Transacetylase Enzym, das Acetyl-CoA und Serin in O-Acetylserin umwandelt

severe combined immunodeficiency (SCID) Immundefekt, der auftritt, wenn sowohl B-Zellen als auch T-Zellen des Immunsystems defekt sind. Bei

etwa 25 % der vererbten SCID-Fälle ist ein Mangel an Adenosin-Desaminase die Ursache.

Shine-Dalgarno-Sequenz Das gleiche wie RBS; Sequenz nahe des Anfangs der mRNA, die von dem Ribosom erkannt wird; existiert nur in prokaryotischen Zellen.

short interspersed nuclear element (SINE) Kurze Sequenzwiederholungen, die einen großen Teil der mittlerepetitiven und hochrepetitiven DNA bei Säugetieren ausmachen

short tandem repeats (STR) Unterklasse der VNTR mit kurzen Sequenzwiederholungen

shotgun-Sequenzierung Eine Methode, bei der das Genom in viele zufällige kurze Fragmente geschnitten wird, um diese zu sequenzieren. Die komplette Genomsequenz wird mithilfe von Computern, die Überlappungen zwischen verschiedenen Sequenzen identifizieren, zusammengesetzt.

Shuttle-Vektor Vektor, der in mehr als einem Typ von Wirtszelle überleben und sich zwischen Wirtszellen bewegen kann

Siderophore Eisen-Chelatbildner, die von Mikroorganismen benutzt werden, um Eisen aus ihrer Umgebung zu binden

Sigma-Untereinheit Untereinheit der bakteriellen Polymerase, die die Promotorsequenz erkennt und bindet

Signalmolekül (s. Induktor) Molekül, das durch Bindung an ein regulatorisches Protein einen regulatorischen Effekt ausübt

Signalprotein Protein, das an der Signalübermittlung beteiligt ist, oft zwischen Zelloberflächenrezeptoren und Genregulatoren

Silberfärbung Ein empfindlicher Farbstoff, der benutzt wird, um Proteine zu färben

Sildenafil Name des Wirkstoffs von Viagra

silence Bezieht sich in der genetischen Terminologie auf das Ausschalten von Genen in relativ unspezifischer Weise.

Simianes Virus 40 (SV40) Krebs verursachendes Virus bei Affen

single nucleotide polymorphisms (SNPs) Ein Unterschied in der DNA-Sequenz zwischen zwei Individuen, der auf dem Austausch einer einzigen Base beruht

Slippage Verrutschen der DNA-Polymerase an einer Sequenzwiederholung auf dem Matrizenstrang und Wiederanlagerung an einer anderen Stelle während der Replikation. Der Tochterstrang besitzt gegenüber dem Elternstrang eine abweichende Anzahl an Wiederholungen.

SLP-Methode (*single-locus probing*) Variante des DNA-Fingerprinting, bei der eine Sonde verwendet wird, die spezifisch für einen Locus ist

SLUG Protein, das die Apoptose blockiert

small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA) Die 16S-rRNA von Prokaryoten oder die 18S-rRNA von Eukaryoten; Ziel-RNA, die aus der Umwelt isoliert wird, um all die verschiedenen Organismen zu identifizieren und zu katalogisieren

Smart Mouse Transgene Maus, die sich durch erhöhte Lernfähigkeit und ein besseres Gedächtnis auszeichnet

somatische Mutation Mutation, die in somatischen Zellen stattfindet; sie wird nicht über die Keimzellen an die nächste Generation weitergegeben.

somatische Zellen Zellen, aus denen der Körper besteht; grenzen sich von den Keimzellen ab.

Somatotropin Ein Polypeptidhormon, das das Zellwachstum und die Reproduktion bei Menschen und Tieren kontrolliert

Sondenmolekül Molekül, das in irgendeiner Weise markiert ist (radioaktiv oder mit einem fluoreszierenden Farbstoff); es wird genutzt, um ein anderes Molekül zu binden und zu detektieren.

Southern Blot Eine Methode, um einzelsträngige DNA zu detektieren, die auf eine Nylonmembran transferiert wurde. Dies geschieht mithilfe einer Sonde, die an DNA bindet.

Spaltimpfstoffe Impfstoffe, die ein Polypeptid des krankheitsverursachenden Agens enthalten. Das Immunsystem bildet Antikörper gegen das Polypeptid und inhibiert den Erreger, indem es das Zielprotein angreift.

späte Gene Gene, die später während der Virusinfektion exprimiert werden und vor allem für Proteine codieren, die am Zusammenbau der Viruspartikel beteiligt sind

spezifische Immunität Art von Immunität, die über einen Zeitraum von mehreren Tagen auf ein spezifisches Antigen reagiert. Sie kann zwischen „Eigen“ und „nicht-Eigen“ unterscheiden, „erinnert“ sich an Pathogene, die bereits in den Körper eingedrungen sind und löst die Antikörperproduktion aus.

spezifische Transkriptionsfaktoren Regulatorische Proteine, die einen Effekt auf ein einzelnes Gen, Operon oder auf eine kleine Gruppe verwandter Gene ausüben

S-Phase Zweites Stadium (Synthesephase) des Zellzyklus, in dem die Chromosomen dupliziert werden

Spindel Auf Mikrotubuli basierende Strukturen, an die Chromosomen binden, die während der Mitose und Meiose getrennt werden

Spleißfaktoren Moleküle, die dazwischen liegende Sequenzen herausschneiden und die Enden eines Moleküls wieder verbinden; bezieht sich in der Regel auf das Entfernen von Introns aus der RNA.

springende Gene Ein populärer Ausdruck für transponierbare Elemente

src-Onkogen Onkogen, das Bestandteil des Rous-Sarkom-Virus ist und ursprünglich aus Hühnerzellen stammt

stable isotope probing (SIP) Methode, um DNA in einer Umweltprobe anzureichern. Eine Umweltprobe wird mit einem stabilen Isotop inkubiert, das in jede sich teilende Lebensform inkorporiert; anschließend wird die markierte DNA isoliert.

Stammzellen Vorläuferzellen, aus denen differenzierte Zellen und weitere Stammzellen hervorgehen

Stanol Sterinderivat, dessen Doppelbindung reduziert wurde

Stärke Glucosepolymer, bei dem die Glucoseeinheiten mittels α -1,4-Bindungen verknüpft sind; dient als Speicher-Polysaccharid bei Pflanzen.

Starlink Umstrittener transgener Mais, der versehentlich in menschliche Lebensmittel gelangte, bevor er abschließend von der Regierung beurteilt wurde

stationäre Phase Stoff in einer Säule, der physikalische oder chemische Eigenschaften besitzt, um einen Mix aus Molekülen (wie beispielsweise Proteine) in Fraktionen zu trennen

Sterine Klasse lipophiler biologischer Verbindungen mit vier fusionierten nicht-aromatischen Ringen

Steroide 1. Polyzyklische lipophile Moleküle zu denen Cholesterin, die Sexualhormone und Cortisol gehören. 2. Sterinderivate mit Keto- anstelle von Hydroxylgruppen

Steroidhormone Hormone mit einer Steroidstruktur, wie beispielsweise Sexualhormone

Steroidrezeptor Protein mit einer Doppelfunktion. Es fungiert als Rezeptor für Steroidhormone und als Transkriptionsfaktor.

Stickstoffmonoxid (NO) Gasförmiges Signalmolekül in tierischen Zellen

Stoffwechsel-Engineering Die Zusammenstellung eines neuen oder verbesserten biochemischen Synthesewegs unter Verwendung von Genen von einem oder mehreren Organismen

STR (*short tandem repeats*) Unterklasse der VNTR mit kurzen Sequenzwiederholungen

Streptavidin Ein kleines, Biotin-bindendes Protein aus dem Bakterium *Streptococcus*

- Streptolysin O** Toxin von *Streptococci pyogenes*, das an Cholesterin in Zellmembranen bindet. Es aggregiert zu einer zirkulären Struktur und bildet eine Pore, durch die Moleküle in die Zelle gelangen können.
- Strukturen** DNA- oder RNA-Sequenz, die für ein Protein oder ein untranslatiertes RNA-Molekül codiert
- subvirale Agenzien** Infektiöse Agenzien, die primitiver als Viren sind und nicht für alle ihre Lebensfunktionen selbst codieren
- Superoxid-Dismutase (SOD)** Enzym, das Superoxidionen in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umwandelt
- Superspiralisierung** Höheres Niveau der Spiralisierung als bei der Doppelhelix
- suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH)** Technik zur Anreicherung von Kulturen in der Metagenomik, die Unterschiede im DNA-Gehalt zweier Umwelten feststellt
- Suspensionskultur** Dedifferenzierung von Pflanzengewebe und anschließendes Wachstum der Zellen in einem Flüssigmedium
- Suspensionszellen** Zellen in Kultur, die in einem flüssigen Nährmedium wachsen, ohne an irgendeiner Oberfläche zu haften
- Symbiontentheorie** Theorie, die davon ausgeht, dass eukaryotische Organellen sich von symbiontischen Prokaryoten ableiten
- Synapse** Verbindungsstelle zwischen Zellen, über die Signale transportiert werden können. Dies geschieht mithilfe chemischer Moleküle, die als Neurotransmitter bekannt sind.
- Syncytium** Gigantische Zelle mit vielen Kernen
- Szintillationszählung** Detektion und Zählung individueller Lichtblitze
- tac-Promotor** Hybridpromotor mit der RBS des *trp*-Promotors und der Operatorsequenz des *lac*-Promotors
- TA-Klonierung** Methode, die die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase nutzt, an den Enden von DNA-Segmenten einzelne 3'-A-Überhänge zu produzieren. Dies kann genutzt werden, um DNA in einen Vektor mit passenden 3'-T-Überhängen zu klonieren.
- Tandem-Massenspektrometrie** Massenspektrometrie-Technik mit mehreren Selektions- und Analyseschritten, die stufenweise kleinere Moleküle als Startmaterial benutzt
- Taq-DNA-Polymerase** Hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die für die PCR verwendet wird
- targeting-induced local lesions in genomes (TILLING)** Mutagenesetechnik, bei der Pflanzensamen mit einem chemischen Mutagen getränkt werden, um Punktmutationen zu verursachen. Die genomische DNA wird durch PCR oder Hybridisierung analysiert.
- Targeting-Vektor** Vektor, der entwickelt wurde, um die Intergration eines Transgens an einer bestimmten Stelle zu ermöglichen
- TATA-bindender Faktor** oder **TATA-Box-Faktor** Transkriptionsfaktor, der die TATA-Box erkennt
- TATA-Box** Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor, der die RNA-Polymerase II zu dem eukaryotischen Promotor dirigiert
- Tau-Protein** Protein, das normalerweise mit Mikrotubuli assoziiert ist und helikale Aggregate bei Patienten der Alzheimer-Krankheit bildet
- Taxonomie** Wissenschaftliche Klassifizierung von Organismen, basierend auf physischer oder genetischer Verwandtschaft
- Telomerase** Enzym, das aus RNA und Protein besteht und die Telomere an den Enden der eukaryotischen Chromosomen verlängert
- Telomere** Spezielle Sequenzwiederholungen, die sich an den Enden der linearen eukaryotischen Chromosomen befinden
- temperatursensitive Mutation** Mutation, die bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedliche Phänotypen zeigt
- Tester** DNA der experimentellen Probe, die Sequenzen enthält, die mit denen der entsprechenden „Umgebung“ identisch sind. Wird bei der suppressiven Subtraktionshybridisierung eingesetzt.
- tetO-Operator** Stelle vor dem *tet*-Operon, wo der Repressor bindet
- tet-Operon** Cluster bakterieller Gene, das Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Tetracyclin verleiht
- Tetracycline** Familie von Antibiotika mit vier verbundenen Ringen, die dem Polyketidweg entstammen
- TetR-Repressor** Repressorprotein, das das *tet*-Operon kontrolliert
- therapeutisches Klonen** Klonen, um Gewebe für Transplantationen zu erhalten, im Gegensatz zur Erschaffung neuer Individuen
- Thermocycler** Maschine, um Proben in einer festgelegten Abfolge schnell auf unterschiedliche Temperaturen zu bringen (bei der PCR)
- Thermogenin** Alternativer Name für das Entkopplungsprotein UCP1
- thermostabil** Die Fähigkeit, hohe Temperaturen ohne Funktionsverlust auszuhalten

θ -(theta)-Replikation Art der Replikation, bei der sich zwei Replikationsgabeln in entgegengesetzte Richtungen bewegen (um ein zirkuläres DNA-Molekül herum)

Thiophen Aromatischer Ring, bestehend aus einem Schwefel- und vier Kohlenstoffatomen

Threoninprotease Eine Protease mit Threonin im aktiven Zentrum

Thrombin Protease, die an der Blutgerinnungskaskade beteiligt ist

Thymidin-Kinase Enzym, das Thymidin und verwandte Nucleoside in ihre Monosphosphat-Derivate umwandelt

Thyroxin Hormon, das in der Schilddrüse gebildet wird

T-Lymphocyten (s. T-Zellen) Immunzellen, die für die zellvermittelte Immunität verantwortlich sind; machen T-Zell-Rezeptoren anstelle von Antikörpern und reifen im Thymus heran.

Tm Temperatur, bei der 50 % des Proteins denaturiert vorliegen

TNF-Gen Gen, das für den Tumor-Nekrosis-Faktor codiert

Todesrezeptor Oberflächenrezeptor einer Zelle, der ein externes „Todessignal“ an intrazelluläre Proteine überträgt, die für das Töten der Zelle verantwortlich sind

Todesrezeptorweg Programm der Apoptose, an dem aktivierende membrangebundene Rezeptoren beteiligt sind, an die externe Signalmoleküle binden

TOL-Plasmid (pTOL) Plasmid, das den Stoffwechselweg zum Abbau von Toluol trägt

Topoisomerase I Enzym, das das Spiralisierungs-niveau der DNA beeinflusst (d.h. die topologische Konformation verändert)

Totipotenz Die Fähigkeit einer Zelle zu dedifferenzieren und in alle möglichen Zelltypen eines Organismus zu redifferenzieren

Toxin Giftiges Molekül biologischen Ursprungs, häufig ein Protein; bezieht sich speziell auf Proteine, die von pathogenen Bakterien hergestellt werden.

Transferrin Ein Eisen-transportierendes Protein bei Tieren

Transfer-RNA (tRNA) RNA-Molekül, das Aminosäuren zu den Ribosomen transportiert

Transformation (bei Krebs) Umwandlung einer normalen Zelle in eine Krebszelle

Transformation (bezogen auf die Bakteriengenetik) Prozess, bei dem Gene als freie DNA-Moleküle in eine Zelle transportiert werden

transgen Ein Organismus, der ein fremdes Stück DNA stabil in sein Genom integriert hat

Transgen Fremdes Gen, das durch einen gentechnischen Prozess in einen Organismus gebracht wurde

transgene Pflanze Pflanze, die ein Gen (Transgen) von einer anderen Pflanze oder einem anderen Organismus enthält

„Transgenic Art“ Kunstform, die transgene Tiere und Pflanzen benutzt

Transition Mutation, bei der eine Pyrimidinbase gegen eine andere Pyrimidinbase oder eine Purinbase gegen eine andere ausgetauscht wurde

Transkription Prozess, bei dem die Information der DNA in RNA umgeschrieben wird

transkriptionelles Gen-Silencing Ein anderer Ausdruck, um Phänomene, die der RNA-Interferenz ähneln, zu beschreiben

Transkriptionsblase Region, wo die DNA-Doppelhelix zeitweilig geöffnet ist, um die Transkription zu ermöglichen

Transkriptionsfaktor Protein, das die Genexpression reguliert, indem es an die Kontrollregion eines Gens bindet

Transkriptionsstartpunkt Startpunkt, an dem ein Gen in seine RNA-Kopie umgewandelt wird

Transkriptom Die Summe sämtlicher RNA-Transkripte, die unter allen Bedingungen in einer Zelle gefunden werden

Translation Proteinsynthese auf Basis der Information, die von der mRNA zur Verfügung gestellt wird

Translationsexpressionsvektor Vektor, der die Genexpression auf Ebene der Translation steigert

Translatom Die Gesamtheit der Proteine, die unter bestimmten Bedingungen innerhalb einer Zelle translatiert wurden

Translokation 1. Transport eines neu hergestellten Proteins durch eine Membran mithilfe einer Translokase. 2. Seitwärtsbewegung eines Ribosoms auf der mRNA während der Translation. 3. Entfernen eines DNA-Segments von seiner ursprünglichen Position und Wiedereinbau an einer anderen Stelle

Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE) Infektiöse Prion-Krankheit

transponierbares Element Ein mobiles DNA-Segment, das in eine andere Wirts-DNA integriert werden kann. Es hat keinen eigenen Replikationsursprung und ist bei der Replikation von dem entsprechenden DNA-Molekül der Wirtszelle abhängig. Beinhaltet sowohl DNA-basierte Transposons als auch Retrotransposons.

- Transposase** Enzym, das für den Ortswechsel des Transposons verantwortlich ist
- Transposition** Prozess, bei dem sich ein Transposon von einem Wirts-DNA-Molekül zu einem anderen bewegt
- Transposon** Ein mobiles DNA-Segment, das in eine andere Wirts-DNA integriert werden kann. Es hat keinen eigenen Replikationsursprung und ist bei der Replikation von dem entsprechenden DNA-Molekül der Wirtszelle abhängig. Beinhaltet sowohl DNA-basierte Transposons als auch Retrotransposons.
- Transversion** Mutation, bei der ein Pyrimidin gegen ein Purin ausgetauscht wird oder umgekehrt
- Trehalase** Enzym, das Trehalose zu zwei Glucosemolekülen abbaut
- Trehalose** Ein nichtreduzierendes Speicherkohlenhydrat bei Pflanzen, das einen Schutz gegen Dehydrierung bietet
- Trehalose-6-phosphat-Phosphatase** Enzym, das ein Phosphat von Trehalose-6-phosphat abspaltet
- Trehalosephosphat-Synthase** Enzym, das UDP-Glucose und Glucose-6-phosphat in Trehalose-6-phosphat umwandelt
- Triplett** (s. Codon) Gruppe von drei RNA- oder DNA-Basen, die eine einzige Aminosäure codieren
- tRNA_i** (Initiator-tRNA) RNA-Molekül, das die erste Aminosäure eines Proteins zum Ribosom transportiert
- tRNA_i^{fMet}** Bezeichnung für eine tRNA, die mit N-Formylmethionin beladen ist, das als erste Aminosäure in einem prokaryotischen Protein Verwendung findet
- Tularämie** Eine Bakterienkrankheit von Nagetieren und Vögeln; führt beim Menschen zu einer Sterblichkeit von 5–10 %.
- tumorinfiltrierende Lymphocyten (TILs)** Weiße Blutkörperchen, die TNF sekretieren
- Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF)** Protein, das Krebszellen tötet und von tumorinfiltrierenden Lymphocyten produziert wird
- Tumorsuppressorgene** Gene, die ungewollte Zellteilungen verhindern (das gleiche wie Antionkogene)
- Two-Hybrid-System** Methode, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Es werden Proteine benutzt, die einander binden und Bestandteile zweier getrennter Domänen eines Transkriptionsaktivators sind.
- Typ-I-Restriktionsenzym** Typ von Restriktionsenzym, das die DNA Tausend oder mehr Basenpaare von der Erkennungsstelle entfernt schneidet
- Typ-II-Restriktionsenzym** Typ von Restriktionsenzym, das in einem definierten Abstand von der Erkennungsstelle schneidet
- Typ-I-Sekretionssystem** Spezielles Exportsystem, das die innere und äußere Membran von gramnegativen Bakterien wie *E. coli* durchspannt
- Typ-II-Sekretionssystem** Spezielles Exportsystem, das nur die äußere Membran durchspannt
- Typ-I-Toxin** Toxin, das eine schädliche (interne) Antwort auslöst, indem es an einen Zelloberflächenrezeptor bindet
- Typ-II-Toxin** Toxin, das die Zellmembran zerstört
- Typ-III-Toxin** Toxin, das in eine Zielzelle eindringt. Es besteht aus einem toxischen Faktor (A-Protein) sowie einer Untereinheit, welche die Bindung vermittelt (B-Protein).
- Tyrosyl-tRNA-Synthetase** Enzym, das eine tRNA mit Tyrosin belädt
- T-Zellen** Zellen des Immunsystems, die Virus-infizierte Zellen entfernen und Faktoren sekretieren, die andere Zellen des Immunsystems aktivieren, speziell B-Zellen. Sind für die zellvermittelte Immunität verantwortlich; machen T-Zell-Rezeptoren anstelle von Antikörpern.
- Umkehrphase-Array** Methode zur Quantifizierung und Detektion von Proteinen. Die Proteine sind an einen festen Träger gebunden, und ein spezifisch markierter Antikörper wird hinzugefügt.
- Umkehrphasenchromatographie** Chromatografiertechnik, bei der eine Proteinlösung unter hohem Druck eine stationäre Phase, an die hydrophobe Alkylketten gebunden sind, passiert. Hydrophobe Moleküle binden an die stationäre Phase, hydrophile Moleküle eluieren von der Säule.
- ρ -unabhängiger Terminator** Terminator der Transkription, der nicht auf das ρ -Protein angewiesen ist
- Unabhängigkeitsregel** Allele eines Gens werden unabhängig voneinander auf die Gameten verteilt.
- unerwünschte Arzneimittelwirkung** Ernstzunehmende Nebenwirkungen eines Arzneimittels oder das Ausbleiben einer Arzneimittelwirkung bei bestimmten Patienten
- universeller genetischer Code** Version des genetischen Codes, die von fast allen Organismen verwendet wird
- UV-Detektor** Gerät, das Änderungen in der Ultraviolettabsorption der mobilen Phase, verursacht durch gelöste Substanzen, misst
- variable number tandem repeat (VNTR)** Cluster von tandemartigen DNA-Sequenzwiederholungen

- gen, deren Anzahl sich von Individuum zu Individuum unterscheidet
- variable Region** Region auf einem Antikörper, deren Sequenz aufgrund von Gensegment-Shuffling variiert, um viele verschiedene Antigenbindungsstellen bereitzustellen
- variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD)** Name für die menschliche Form von Rinderwahnsinn
- Varkud-Satellitenribozym** Kleines Ribozym, das die Selbstspaltung und Replikation der RNA des Varkud-Satellitenvirus initiiert; kommt in den Mitochondrien von *Neurospora* vor.
- vCJD (variant Creutzfeldt-Jakob disease)** Name für die menschliche Form von Rinderwahnsinn
- Vektorimpfstoff** Impfstoff, bei dem ein nichtpathogenes Virus oder Bakterium (Vektor) so verändert wird, dass es ein Protein oder Peptid des krankheitsverursachenden Agens auf seiner Oberfläche exprimiert. Das Immunsystem bildet Antikörper gegen das exprimierte Protein, die eine Immunität gegen das Agens verleihen.
- vergleichende Genomik** Vergleich der Genomsequenzen verschiedener Organismen, um die Funktionen von Genen oder Proteinen zu ermitteln, indem man sie mit bereits charakterisierten Beispielen vergleicht
- Verpackungskonstrukt** Defektes Provirus, das in die DNA der Produzentenzelle eingebaut wird, um Viruspartikel herzustellen. Es wird aber selbst nicht verpackt, da das Verpackungssignal fehlt.
- Verpackungssignal** Ort auf dem Retrovirusgenom, der essenziell für die Verpackung der RNA in das Viruspartikel ist
- Verzweigung** (in einem evolutionären Stammbaum) Trennung zweier verschiedener taxonomischer Gruppen während der Evolution
- Viagra (Sildenafil)** Medikament zur Behandlung von Männern mit Erektionsstörungen. Der Wirkstoff inhibiert die Phosphodiesterase 5 und hält das cGMP-Level hoch.
- Virion** Viruspartikel
- Virosphäre** Die Gesamtheit aller Viren in unserer Biosphäre
- Virulenzfaktoren** Vererbte Eigenschaften, die es pathogenen Mikroorganismen erlauben, erfolgreich einen Wirt zu infizieren
- Virulenzplasmid** Plasmid, das Gene trägt, die für Virulenz und Pathogenität verantwortlich sind
- virusinduziertes Silencing** Ein anderer Ausdruck, um Phänomene, die der RNA-Interferenz ähneln, zu beschreiben
- VNTR (variable number tandem repeats)** Cluster von tandemartigen DNA-Sequenzwiederholungen, deren Anzahl sich von Individuum zu Individuum unterscheidet
- v-onc** Von Viren stammendes Onkogen
- vorzeitige Seneszenz** Eintritt in die Seneszenz vor Ablauf der normalen Anzahl an Zellteilungen
- VP16-Aktivatorprotein** Genaktivatorprotein des Herpes-simplex-Virus
- Wachstumsfaktor** Ein Protein oder ein anderer chemischer Botenstoff, der im Blut zirkuliert und an der Oberfläche von Zellen Wachstumssignale übermittelt
- weaponize** Bezieht sich auf Agenzien, die so modifiziert wurden, dass sie als Waffen verwendet werden können, wie beispielsweise die Herstellung eines haltbaren Pulvers.
- 4S-Weg** Vierstufiger Prozess zur Eliminierung von Schwefel aus Dibenzothiophen und verwandten Molekülen
- Western Blotting** Detektionsmethode, bei der eine Sonde, normalerweise ein Antikörper, an ein Zielmolekül bindet
- West-Nil-Virus** Virus aus der Familie der Flaviviren, das ursprünglich aus Mittel-Ost-Afrika stammt und sich jetzt in Nordamerika ausbreitet
- WIN-Substanz** Antivirale Substanz, die die Anheftung vieler Picornaviren verhindert
- wobble** Weniger starre Basenpaarung bei der Codon/Anticodon-Paarung im Rahmen der Translation
- Xenobiotika** Chemische Verbindungen mit signifikanter biologischer Aktivität, die aber natürlicherweise nicht in der Umwelt vorkommen
- Xenöstrogen** Fremdes, polyzyklisches Molekül, das an Steroidrezeptoren bindet und die Wirkung von Östrogenen nachahmt
- X-Inaktivierung** Die vollkommene Stilllegung der Genexpression bei einem der beiden X-Chromosomen in Zellen weiblicher Säugetiere
- X-Phos** 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, ein künstliches Substrat, das von der Alkalischen Phosphatase gespalten wird; es entsteht ein blauer Farbstoff.
- Xylose** Ein Zucker mit fünf Kohlenstoffatomen. Er ist ein wichtiger Bestandteil verschiedener Hemicellulose-Polysaccharide.
- yeast artificial chromosome (YAC)** Vektor in einfacher Kopienzahl, der auf dem Hefechromosom basiert und in der Lage ist, sehr lange DNA-Inserts zu tragen. Wird verbreitet im Humangenomprojekt eingesetzt.

Yersinia pestis Bakterium, das die Beulenpest und die Lungenpest verursacht

zelluläre Seneszenz Kultivierte Säugerzellen stellen ihre Zellteilung ein; wird auch replikative Seneszenz genannt.

zellvermittelte Immunität Wird durch T-Zellen und Zell-Zell-Interaktionen vermittelt, statt von Antikörpern, die von B-Zellen synthetisiert werden

Zellzyklus Abfolge der Entwicklungsphasen einer Zelle zwischen zwei Zellteilungen

zentrales Dogma Der Basisplan des Flusses der genetischen Information in lebenden Zellen besagt, dass die in der DNA gespeicherte Information über das Zwischenprodukt RNA in Richtung der Proteine fließt und nicht umgekehrt.

Z-Form Alternative Form der Doppelhelix; sie ist linksgängig und weist 12 bp pro Windung auf. Diese Form kommt bei DNA und dsRNA vor.

Ziel-DNA DNA, die das Ziel für eine Sonde im Rahmen einer Hybridisierung oder Amplifizierung (PCR) darstellt

Zielsequenz 1. Sequenz in einem Wirts-DNA-Molekül, in die sich ein Transposon integriert. 2. Sequenz innerhalb einer DNA-Matrize, die durch eine PCR-Reaktion amplifiziert wird

Zoo-Blot Vergleichende Southern-Blots mithilfe von DNA-Zielmolekülen von verschiedenen unterschiedlichen Tieren, um festzustellen, ob die Sonden-DNA aus einer codierenden Sequenz stammt

zufällig vervielfältigte polymorphe DNA (RAPD) Methode, um genetische Ähnlichkeiten zu untersuchen, indem mittels PCR zufällig ausgewählte Sequenzen amplifiziert werden

zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D-Page) Technik zur Trennung von Proteinen, zuerst anhand der Größe, dann mittels isoelektrischer Fokussierung (d.h. nach Ladung)

Zweikeimblättrige (s. Dikotyle) Pflanzen mit breiten Blättern und einer netzförmigen Aderung; besitzen zwei Keimblätter.

zwei-Komponenten-Regulationssystem Regulationssystem, bestehend aus einer Sensorkinase und einem DNA-bindenden Regulator

zyklische Phosphodiesterase Enzym, das zyklische Nucleotide wie cAMP und cGMP abbaut

zyklisches AMP (cAMP) (zyklisches Adenosinmonophosphat) Signalmolekül, das bei der allgemeinen Regulation zum Einsatz kommt (Bakterien) oder als sekundärer Botenstoff fungiert (höhere Organismen). Ein zyklisches Mononucleotid, das aus ATP synthetisiert wird

zyklisches GMP (cGMP) (zyklisches Guanosinmonophosphat) Signalmolekül, das als sekundärer Botenstoff in eukaryotischen Zellen genutzt wird

Zyklussequenzierung Technik, die PCR und Kettenabbruchsequenzierung kombiniert, um die DNA-Sequenz zu ermitteln

Index

A

- ρ -abhängiger Terminator 35
- AB0-Blutgruppensystem 616
 - Moleküle 615
 - Vaterschaftstest 617
 - Vererbung 616
- Abrin 602
- Acetylserin-Sulphydrylase 427f
- Ackerschmalwand, siehe *Arabidopsis thaliana*
- Actin 450
- Adams, H. B. 630
- addiction module* 546–548
- Adenin 3
- Adeno-assoziiertes Virus (AAV) 462f
- Adenosin-Desaminase 464f
 - Mangel (ADA-Mangel) 437
- Adenovirus 26
 - Eindringen in menschliche Zellen 459
 - Gentherapie 458–461
 - Probleme als Vektor 461
 - Struktur 458
 - Vorteile als Vektor 460
- Adenylat-Cyclase 504–506, 562
 - Kontrolle durch Glucosetransport 505
 - Kontrolle durch G-Proteine 506
- adhärente Zelllinien 21
- Adhäsion 555f
- Adipositas 513–515
 - Einfluss von Genen 516
 - viral verursachte 515
- Adjuvans 189
- ADP-Ribose 560
- ADP-ribosylierendes Toxin 560
- Adrenalin 520
- β -adrenerger Rezeptor 515
- Aedes aegypti* 422
- Aequorea victoria* 609
- Aequorin 608–610
- Affinitätschromatographie 270
- Agarose 56
- aggressive Gentherapie 457f
 - gegen Krebs 467–469
- Agrobacterium* 384–388
 - Herbizidresistenz 395
- Aids 25, 158, 573–579
 - Behandlung 576
 - Behandlungskosten 638
 - Therapie mit Medikamentencocktail 578f
- Aktivatorprotein 33
- Alcaligenes eutrophus* 376
- Alkalische Phosphatase 256, 258
- Alkohol 354–356
 - aus Cellulose 358f
 - Nutzung als Kraftstoff 355
- alkoholische Gärung 354–356
- Allel 4
- Allolactose, Struktur 41
- allosterisches Desoxyribozym 160
- alternative splicing library* 331
- Altersdiabetes 532
- Alu-Sequenz 237
- Alzheimer-Krankheit 545f
 - Impfstoff 546
- Amantadin 573f
- Aminoacyl-tRNA-Synthetase 50, 324–326
- 7-Aminocephalosporinsäure 372f
- Aminopeptidase 271
- Aminosäure, Bedeutung einer einzelnen 117
- Aminosäuresequenz 49
- Amniocentese 453
- Amylase 357f
- Amyloid β ($A\beta$) 545f
- Amyloidaggregat 584
- Amyloidvorläuferprotein (APP) 545f
- Amylopektin 356f
- Amylose 356f
- angeborene supralvalvuläre Aortenstenose (SVAS) 439
- Angelman-Syndrom 442–444
- Anopheles gambiae* 422–424
- Antibiotikum
 - alternative Methoden 556
 - gezielte Entwicklung 557
 - Resistenz 556, 637f
- Anticodon 49
- Antigen 168–170
- Antigen Capture Immunoassay 290
- Antikörper 168–187, 332
 - bispezifischer 179–181
 - Funktion 168
 - gentechnische Veränderung 178f
 - klinische Anwendung 176f
 - leichte Kette 171
 - medizinische Anwendung 174f
 - monoklonale 174f
 - polyklonale 174
 - schwere Kette 171
 - Struktur 168, 171f
- Antikörper-Ionenkanal-Biosensor 610
- Antionkogen 480f, 487–489
- Antioxidantien, Verlängerung der Lebensspanne 529
- antiparallele Stränge 3
- Antisense-DNA 548f
- Antisense-Gen 470
- Antisense-Oligonucleotid 124–133, 549
 - Probleme 129
- Antisense-RNA 120–133, 154f, 469–471
 - biologische Phänomene 120–124
 - Expression 129
 - im Labor 124–133

Antisense-Strang 34
 Antisense-Technik 430f
 Antisense-Therapie 131
 Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz 51f
 Antiterminatorprotein 38
 Antitoxintherapie 564f
 antivirales Protein 569f
 Apolipoprotein 545
 Apoptose 533–535
 – Ablauf 534
 – Aktivierung 539
 – Bakterium 546–548
 – Beseitigung von Apoptose-
 körpern 542f
 – Exekutionsphase 541f
 – Immunantwort 544
 – Kontrolle 543–545
 – Krebstherapie 548f
 – mitochondrialer Weg 538–541
 – proteolytische Kaskade 535–538
 – Säugtiere 538–541
 – Todesrezeptorweg 538f
 – Unterschied zu anderen Formen
 des Zelltods 534f
 Apoptosekörper 534, 542f
 – Beseitigung 542f
 Apoptosom 540
 Aptamer 471f
 – Selektion 472
 Aquaporin-7 519
Arabidopsis thaliana 22f, 136, 384
 – Genom 235
 Arenavirus als Biowaffe 599
 aromatische Ringverbindung 360f
 – Abbau 360f
 Ascosporen 16
 Ascus 16
 Aspartatprotease 271f
Aspergillus nidulans, Genom 235
Aspergillus niger 14, 357
Aspergillus oryzae 14
 Assembler 222
 Assoziationsanalyse 347
 ATP-Synthase 222, 445
 attenuierter Impfstoff 187f
 Aufspaltungsregel 4
 Ausschlusschromatographie 270
 automatisierte Zellselektion 308
 Autoradiographie 60–63, 105
 Auxin 386
 Avidin 64
 Azidothymidin (AZT) 576

B

Bacillus amyloliquefaciens 357
Bacillus anthracis 563f, 592
 – als Biowaffe 594–596
Bacillus subtilis 12, 161
Bacillus thuringiensis 396, 588
 Bacmid-Shuttle-Vektor 311
 Bacteriocin 11
 Bacteriorhodopsin 344
 Baculovirus 310f
 bakterielle Erreger 597
 bakterielle Infektion 551–566
 – Antitoxintherapie 564f
 – molekulare Methoden zur
 Diagnose 552f
 – Schutz durch polyvalente
 Inhibitoren 564f
 bakterielles Toxin 558f
 – Beispiele für A-B-Typ 559
 Bakterien 3f, 8, 12, 94–97
 – in der Biotechnologie 12
 – Kultivierung 10
 Bakterienrasen 25
 Bacteriocin 588
 bakteriologische Kriegsführung
 634f
 Bakteriophage 24, 26
 – *addiction module* 547f
 – P1 391
 – Zelltod 547
 Bakteriophagenvektor 73
 Bakterium
 – Adhäsion 555f
 – als Biowaffe 597
 – Apoptose 546–548
 – Aufnahme von Eisen 556–558
 – Eindringen in tierische Zellen
 555f
 – Eiskeimbildung 359f
 – Expression eukaryotischer
 Proteine 297–305
 – Infektion 551–566
 – Nanokristalle 212
 – Virulenzfaktoren 553f
 – Wiegen 206f
 Barcodesequenz 148
 Base 3
 Basenaustauschmutation 240
 59-Basen-Element (59-be) 345
 Basenpaarsubstitution 240
 Basensequenz 102
 basisches Peptid 131f

Bcl-2 540
 – Proteinfamilie 526
 Binnig, G. 202
 Bioaugmentation 351
 Bioethik 629–655
 – Fehlinformationen 631f
 – Klonen 632
 – Konflikt mit egalitären
 Ideologien 652f
 – kulturelle Unterschiede 632f
 – Macht 630f
 – Probleme auf lange Sicht 654f
 – Unwissenheit 631f
 – Zugang 630f
 Bioinformatik 238–240
 biolistische Methode, siehe
 Partikelkanone
 biologische Kriegsführung
 587–611
 – Aufbewahrung der Erreger 592
 – Ausbreitung 592
 – bei Insekten 589
 – bei *Paramecium* 589
 – bei Wespen 589f
 – beim Menschen 590
 – geeignete Pathogene 594
 – gegen Landwirtschaft 603f
 – Kosten 591
 – Präparation 592f
 – psychologische Wirkung 591
 – Schutzmaßnahmen 591
 – wichtige Faktoren 591–594
 – siehe auch Biowaffen,
 Bioterrorismus
 biologische Sanierung, siehe
 Bioremediation
 Biologische Schutzstufe 593
 biologische Vielfalt 640
 Biomarker 339
 biomolekularer Motor 222–224
 Biopanning 284f
 Bioreaktor 14
 Bioremediation 349–351, 354
 Biosensor 607–610
 Biosensorsystem 369f
 Biostimulation 350f
 Biosynthese, kombinatorische 373
 biosynthetischer Kunststoff 376f
 Biotechnologie, mögliche
 Gefahren 633f
 Bioterrorismus 587–611, 634f
 – Milzbrand 591

- siehe auch Biowaffen, biologische Kriegsführung
- Biotin 63, 292
- Biowaffen 595
 - Bakterien 597
 - Anforderungen 594
 - Ethik 634f
 - gentechnische Modifikation 604–606
 - gereinigte Toxine 599
 - Nachweis 607–610
 - virale Erreger 598f
- Blastocyste 411
- Blotting 66
- Blutantigen 615f
- Blutgruppenbestimmung 615–617
- Blutstammzelle 464f
- Botulinustoxin (Botox) 600f, 631
 - als Biowaffe 599–601
 - Aufnahme an Nervenendigungen 601
 - Gencluster 600
 - Wirkung 600
- Bovine Spongiforme Encephalopathie (BSE) 580f
- BRCA1-Gen 492f
- BRCA2-Gen 492f
- 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) 339f
- Brucellose als Biowaffe 597
- Brustkrebs 176
- Bt-Pflanze, Vorteile 397
- Bt-Toxin 396f
 - und Schmetterlinge 403f
- Buchnera* 348
- Burkholderia pseudomallei* als Biowaffe 597
- Burkitt-Lymphom 487
- B-Zelle 187
 - als Biosensor 609
 - Gedächtniszelle 187
- bZIP-Proteine 44–46
- C**
- Caedibacter* 589
- Caenorhabditis elegans* 17f, 106, 136, 530–532
 - Apoptose 535–538
 - Dauerlarve 530–532
 - Genom 235
 - Geschlechtsbestimmung 543f
 - Lebensspanne 530–532
- Lebenszyklus 18
- Calmodulin 291
- cAMP 40
 - Kaskade 506
- Cancerogen, siehe Karzinogen
- candidate cloning* 447f
- CAP 39
- Capsid 23
- Cap-Struktur 48
- CAR (Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor) 458
- Carboxypeptidase 271
 - E 517
 - H 509
- Carrier 189f
- Caspase 535–538
 - Methoden zur Aktivierung 537
- Caspase-aktivierte DNase (CAD) 541
- Catecholamin 520
- Catenane 89
- CD-Antigen 185
- cDNA 79f, 84, 113, 144
 - Bibliothek 228, 343
 - Microarray 250
- CDR, siehe *complementarity determining region*
- CdSe-Nanostäbchen 209
- Cellulose 358f
 - Abbau 358f
- Centromer 96
- Cephalosporin C 372f
- CFTR-Protein 449
- CG-Inseln 46
- Chaperonine 38
- Checkerboard-Hybridisierung 553
- chemische Markierung, Nucleinsäure 63f
- Chemokin 575
- Chemokinrezeptor 575f
- Chimäre 407, 634
- Chloroplast 54
- Chloroplasten-Transit-Peptid 395
- Cholera-Bakterium 556
- Cholera-Toxin 560–563
 - Bestandteile 561
 - Eindringen in die Zelle 561
 - Struktur 561
 - Wirkungsmechanismus 562
- Cholesterin 371
- Chorea Huntington 440, 452
- Chromatin 5, 46
- Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) 255
- Chromatographie 269
- Chromosom
 - lineares 14
 - Modifikation 419
 - polytänes 20
- chromosome walking* 231f
- Chromosomenanomalie 448
- Chromosomenkarte, cyto-genetische 230f
- Chronic Wasting Disease (CWD) 580
- Circumsporozoiten-Protein 423
- Cistron 33
- CJD 580
- Claviceps purpurea* 604
- cleavage binding factor* 48
- ClfA-Protein (*clumping factor A*) 177
- Clostridium botulinum* als Biowaffe 599–601
- Codon 49, 299f
- Codongebrauch 50, 239f, 299f, 397
 - Auswirkung auf Genexpression 299f
- Co-Immunpräzipitation 288f
- Colicin 11, 588
- complementarity determining region* (CDR) 176
- Contig 229
 - Karte 229
- controlled pore glass* (CPG) 98
- Coomassie-Blau 265
- CopyCat 430
- Corepressor 41
- Corynebacterium glutamicum* 12
- Cosmid 74f
- Cosuppression 138
- C-Peptid 509
- Craighead, H. 206
- CREB-Protein 506
- Cre/loxP-System 391f, 420
- Cre-Rekombinase 419
- CRE-Sequenz 506
- Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) 580f
 - siehe auch CJD
- Crossing-over 190, 457
- CRP-Protein 39, 505
- Cry-Protein 396f
- CTXphi 561

- Cyclin-abhängige Kinase (CDK) 478f
 Cycline 478f
 Cysteinbiosyntheseweg 428
 Cysteinprotease 271f
 cystische Fibrose 437, 449f
 – Gen 450
 – Gentherapie mit Adenoviren 461
 Cytochrom *c* 540
 cytogenetische Chromosomenkarte 230f
 Cytokin 469
 Cytokinin 386
 Cytosin 3
 – Desaminase 469
- D**
- Danio rerio*, siehe Zebrafisch
 Data-Mining 239
 Dauerlarve, Nematoden 530–532
db-Gen 514
 Defensin A 423
 degenerierte Primer 111
 Degradom 271
 Dehydrogenase 321
 Deletion 241
 Delta-Endotoxin 396
 Demethylasen 46
de novo-Methylasen 46
 Designerbaby 648
 Desoxynucleotid 103
 Desoxyribonucleinsäure, siehe DNA
 Desoxyribose 3
 Desoxyribozym 473
 – allosterisches 160
DHFR-Gen 313
 Diabetes, Stammzelltherapie 511
 Diabetes mellitus 508f
diabody 179f
 Diagnose, bakterielle Infektion 552f
 Dibenzothiophen (DBT) 366–368
 Dicer 134
 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure 365
 dichotome Verzweigung 242
 Didesoxynucleotid 103–105
 Differenzial-Interferenzkontrastmikroskop 535
 differenzielle Fluoreszenzinduktion (DFI) 193f
 Digoxigenin 63
 Dihydrofolat-Reduktase 313
 Diisopropylamin 100
 Dimethoxytritylgruppe 99
 Dioxygenase 361
 Diphtherietoxin 560
 diploid 12f
 direkter Immunoassay 290f
 DISC 539
DMD-Gen 451
 DMT-Gruppe, siehe Dime-thoxytritylgruppe
 DNA (Desoxyribonucleinsäure) 2f, 31–54, 56, 218, 222
 – A-Form 3
 – B-Form 3
 – chemische Synthese 98–102
 – Crossing over 190
 – Eukaryoten 79–81
 – Excisionsreparatur 160
 – Forensische Tests 617
 – homologe Rekombination 190f
 – Hybridisierung 66, 220, 251–253
 – Impfstoff 194–196
 – Isolierung 56
 – *junk* DNA 171
 – komplementäre DNA, siehe cDNA
 – komplementäre Stränge 64–66
 – Konstrukt 73
 – kontrollierte Denaturierung 220f
 – kreuzförmige DNA 218
 – Mensch 232–238
 – mitochondriale 54
 – mobile 28
 – Mutationen 240–242
 – Nachweis des Einbaus 389–391
 – Nanomaschine 219f
 – Nanomodul 219
 – radioaktive Markierung 62
 – Replikation 88
 – Struktur 46
 – Synthese 87–117
 – thermostabile 8
 – Transport mit Nanopartikeln 211
 – Wiegen 206f
 – Z-Form 3
 DNA-Adenin-Methylase (Dam) 93
 DNA-Analyse
 – Datenschutz 648–650
 – Erbkrankheiten 650
 – Privatsphäre 648–650
 DNA-Aufnahme in der Natur 431–433
 DNA-Chip 248
 DNA-Cytosin-Methylase (Dcm) 93
 DNA-Fingerprinting 617
 – MLP-Methode 618
 – Schritte 618f
 – SLP-Methode 618
 – STRs 620f
 – Varianten 618
 – VNTRs 620f
 DNA-Gyrase 4, 88–90
 DNA-Helikase 88–90
 DNA-Hybridisierung, Microarray 251–253
 DNA-Invertase 241
 DNA-Kassette 410
 DNA-Ketten-Terminator 468f, 576
 DNA-Ligase 88f
 DNA-Matrize 103
 DNA-Microarray 248–253
 – Herstellung 249–251
 – Hybridisierung 251–253
 DNA-Polymerase 8, 88, 91–93, 102, 106
 – Funktion 91f
 – Struktur 91f
 DNA-Replikation 88
 – Eukaryoten 94–97
 – genetische Einheiten 94–97
 – Prokaryot 94–97
 – θ -Replikation 94
 – *rolling circle*-Replikation 95
 DNA-SELEX 156
 DNA-Sequenziergerät 109
 DNA-Sequenzierung 102–106
 – Nachweis 109f
 DNA-Shuffling 328f
 DNA-Syntheseapparat 98
 DNA-Test
 – in der Forensik 617
 – Nahrungsmittelkontrolle 625
 – Wahrscheinlichkeit 624
 – Zulassung vor Gericht 624f
 DNazym, siehe Desoxyribozym
 Dolly, das KlonSchaf 424–427
 Dopamin 520
 Doppelhelix 3, 88
 Dot-Blot-Methode 68, 622
 Down-Syndrom 438

Drosophila 19f, 22, 421–423
 – Genom 226, 235
 – Lebenszyklus 19
 – Verlängerung der Lebensspanne durch Antioxidantien 529
 dsRNA 134
 Dsz-System, Modifikation 367
 Duchenne-Muskeldystrophie 437, 450–452
 Dünnschichtchromatographie 292
 Duplikation 241
 Durchflussscytometrie (FACS) 185–187, 246, 308
 Dynein 223
 Dysgenik 646
 Dyskeratosis congenita 527
 Dystrophin 450

E

E1A-Protein 460
 Ebola-Virus als Biowaffe 598f
 Ecdyson 418
error prone-PCR (epPCR) 323
 Effektormolekül 160f
 Eigler, D. M. 202
 Einschlusskörper 300, 302f
 Einzelketten-Fv 178f
 Eiskeimbildung 359f
 Ektotoxin, siehe Exotoxin
 Ektromelievirus 605f
 Elastin 439
 Elastin-ähnliches Polypeptid (ELP) 332
 Elektrophorese 56–58, 104
 Elektroporation 76, 131
 Elektrosprayionisation (ESI) 273–276
 ELISA-Assay 181–183, 289
 – Diagnose 182f
 – Grundlagen 182
 – Schwangerschaft 182f
 embryonale Stammzelle 411f
 – Therapie mit 468
 Endocytose 131
 Endopeptidase 271, 509
 Endosymbiontentheorie 54
 Endotoxin 558
 Enhancer 43f
Entamoeba 594
 Enterobactin 556–558
 Enterochelin 556–558

Enterochelintransportsystem 558
 Enterotoxin 563
 Enterovirus 568
 Entkopplungsprotein (UCP) 519
 Enviropig 409
 Enzym, industrielle Nutzung 357f
 epigenetische Veränderungen 442–444
 Epithelzelle 478
 Epitop 169
 EPSPS 394f
 Ergotismus 604
 Erhaltungsmethylasen 46
 erworbene Immunität 170
 Erythromycin 374f
 Erythropoetin 462f
Escherichia coli 8–10, 212
 – Adenylat-Cyclase-Aktivität 505
 – Bakteriocinproduktion 588
 – Chromosom 11
 – Codongebrauch 299
 – Colicinproduktion 588
 – Genom 235
 – Indigo-Herstellung 362
 – Konjugation 28
 – MaIE-Protein 305
 – MazE 546f
 – MazEF-Suizidsystem 547
 – MazF 546f
 – Pathogenitätsinseln 554
 – Proteinherstellung 409
 – subzelluläre Struktur 9
 – Wiegen 206
 – Zelltod 546f
 essbarer Impfstoff 196–198
 EST, siehe *expressed sequence tag*
 4-Ethylbenzoat 364
 Ethylmethansulfonat 400
Eubacterium 371
 Eugenik 456, 645–648
 – siehe auch Dysgenik
 Eukaryot 12f, 42, 94
 – bakteriologische Kriegsführung unter niederen 589
 – DNA-Replikation 94–97
 – Genom 236
 – mRNA 53f
 – Proteinexpression 306–314
 – Translation 53f
 – Zellzyklus 96
 eukaryotischer Zellzyklus 478f
Euplotes 49

Exon 48, 234
exon-scanning array 254
 Exopeptidase 271
 Exotoxin 559
 – Typ-I-Toxin 559
 – Typ-II-Toxin 559
 – Typ-III-Toxin 559
 Explantat 382
expressed sequence tag (EST) 228
 Expressionsanalyse 346f
 Expressionsbibliothek 79–81
 – immunologisches Screening 81
 Expressionsvektor 80, 297f
 – Eigenschaften 81f
 – shRNA 143

F

Fab-Fragment 172, 178
 30-nm-Faser 7
fast neutron mutagenesis 399
 Fc-Fragment 172
 Fehlpaarungsreparatursystem 93
 Ferritin 556
 Fettabbau 518f
 Fettleibigkeit, siehe Adipositas
 Fettstoffwechsel 518f
 Feynman, R. 200
 Fierce Mouse 408
 Fife, Herzog von 628
 Filovirus als Biowaffe 598f
 Fimbrie 555
 Fimbrienadhäsion 555
 FISH, siehe Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung
 FLAG-Tag 83, 279
 Flavivirus als Biowaffe 599
 Fleming, A. 245
 Flip-Flop-Mechanismus 581
 Flippase 15
 Floral-dip-Methode 387f
 Flp-Protein, siehe Flippase
 Flp-Rekombinase (Flippase) 419
 – siehe auch Flippase
 Flugzeitdetektor (TOF) 273–275
 Fluoreszenz 63
 fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) 185–187, 193
 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) 68f
 Fluoreszenzmikroskopie 193
 Folgestrang, Synthese 92f
 Forensik 650f

- forensische Molekularbiologie 613–628
N-Formylmethionin 51
 Fos 44f
 fossiler Brennstoff, Bioraffinerie 366–368
 Fragiles-X-Syndrom 437, 440, 442
Francisella tularensis als Biowaffe 597
 Fremdbestäubung 380
 Frost 359f
functional cloning 447f
 funktionelle Genomik 248f
 – Pflanze 398–402
Fusarium solani 373
 Fusionsprotein 304f
 – Expressionsvektoren 304f
 Fv-Fragment 178
- G**
 β -Galactosidase 39, 257
 Gamet 12
 Ganciclovir 468f
 Gangliosid GM1 561
 Gedächtniszelle 187
 Gelelektrophorese 56f, 66, 113
 Gelmikrotropfen-Technologie 308
 Gen 234
 – chemische Synthese 102
 – cystische Fibrose 450
 – DNA-Shuffling 328f
 – Duchenne-Muskeldystrophie 451
 – Einfluss auf das Verhalten 652f
 – für Erbdefekt verantwortliches 447f
 – Identifizieren eines defekten 447f
 – modularer Aufbau 171
 – Struktur 33
 – und Krebs 480f
 Genbibliothek 77–79
 – Herstellung 77f
 – Screening 78f
 Gendoping 649
GENE impedance (GENEi) 138
gene mining 337
 Genectin 312
 Genersatztherapie 456f
 Genetik und Verhalten 520f
 genetisch modifizierter Organismus (GMO) 639f
 genetische Analyse 452f
 genetische Einheiten 27–30, 94
 – DNA-Replikation 94–97
 genetische Evolution 242–245
 genetische Information, Besitz 653f
 genetische Prägung, siehe genetisches Imprinting
 genetische Störungen 435–453
 – höhere Organismen 436–438
 genetischer Code 49
 – universeller 49
 genetischer Marker 226
 genetischer Regulationskreis 369f
 genetisches Imprinting 429
 – Störungen 442–444
 Genexpression 32–34, 46f, 138, 248f, 253, 260
 – Analyse mit RNAi 140f
 – Hefe 249
 – miRNA 138
 – Regulation 38
 – Transkription 32–34
 Genfalle 346
 Genfamilie 243
 Genfusion 256
 Genkanone, siehe Partikelkanone
 Genkartierung 226
 Genkassette 345
 Genkopplung 226
 Genkunst 642f
 Genom
 – Eukaryot 236
 – menschliches 232–238
 – Sequenzierung 231–233
 Genom-Browser 239
 Genomik 223–260
 – funktionelle Genomik 248f
 – Medizin 240
 – vergleichende Genomik 239
 Genomkarte 226–233
 – genetische Karte 226
 – physikalische Karte 226, 228f
 Genotyp 4f, 615
 Gen-Silencing
 – bei Pflanzen 398f
 – transkriptionelles 138
 Gensuperfamilie 243
 Gen-Targeting 415
 Gentechnik
 – Antikörper 178f
 – Bindungsproteine 332f
 – Biowaffenherstellung 604–606
 – *diabody*-Konstrukt 180
 – Erzeugen getarnter Viren 606f
 – essbarer Impfstoff 196–198
 – Herstellung von Insulin 511–513
 – Modifikation des Dsz-Systems 367
 – Nanomaßstab 218f
 – Pflanzen 383f
 – Verbesserung des Stärkeabbaus 357f
 – *Zymomonas* 355f
 Gentest 240
 Gentherapie 455–474
 – AAV 462f
 – Adenoviren 458–461
 – aggressive 457f
 – Antisense-RNA 469–471
 – Crossing-over 457
 – DNA-Polymer-Komplex 466
 – embryonale Stammzellen 468
 – Ethik 635f
 – *ex vivo* 456
 – Genkanone 466
 – grundlegende Prinzipien 456f
 – *in vivo* 456
 – Krebs 467–469
 – Lipofektion 466f
 – nichtvirale 465f
 – Nucleinsäuren 466
 – Retroviren 463f
 – rezeptorvermittelte Aufnahme 466
 – Ribozyme 472f
 – Selbstmordgene 467–469
 – verkapselte Zellen 466
 – verwendete Vektoren 457
 – Ziele für Behandlungen 458
 gerichtete Evolution 323f
 Gesundheitsfürsorge 634
 gezielte Mutagenese 116f
 GFP, siehe grün fluoreszierendes Protein
 Ghrelin 518
 glatte Enden 58
 Gleitkammer 91
 Globinfamilie 244f
 Glucocorticoidhormon 418
 Glucose aus Cellulose 358f
 Glucose-Oxidase 607–609
 – Biosensor 608
 Glutathion-S-Transferase (GST) 279
 Glycoprotein 169

Glyko-Engineering 326
 Glykogen 357
 Glyphosat 394f
 Goldener Reis 384
 G-Protein 502, 505f
 Gramicidin-Ionenkanal 217
 Größenquantisierungseffekt 210
 grün fluoreszierendes Protein
 (GFP) 256, 259, 346, 642
 Gruppe-I-Intron 151
 Gruppe-II-Intron 152
 Guanin 3
 Guanylat-Cyclase
 – Formen 507
 – Kontrolle durch Stickstoff 507

H

Haarnadelribozym 153, 155
Haemophilus influenzae 232
 hämatopoetische Stammzelle 464f
 Hammerkopfribozym 151–153,
 155
 Hämoglobin 244
 Hämolysin 337, 558
 Hämophilie 437
 Haploinsuffizienz 438f
 HAT, siehe Histon-Acetyltrans-
 ferase
 Haupthistokompatibilitätskomplex
 (MHC) 170
 Haushaltsgene 32
 Hc-Pro 138
 HDAC, siehe Histon-Deacetylase
 Hefe 13–17, 355
 – chronologisches Altern 532
 – Gal4-Protein 327
 – Genexpression 249
 – Knospung 16
 – Kreuzungstypen 16f
 – Lebensspanne 532f
 – *MAT*-Locus 17
 – Microarray 250
 – 2- μ m-Plasmid 73
 – Plasmid 15
 – Prion 584f
 – Proteinexpression 306–309
 – replikatives Altern 532
 – 2- μ m-Ring 15
 – Screening von Prionen 584f
 – Zellstruktur 15
 – Zellzyklus 16f
 HeLa-Zellen 21

Helfervirus 27, 75
Heliothis virescens 22
 Hemicellulose 358
 Hemimethylierung 93
 Hepatitis-C-Virus 158
 Hepatitisdeltavirus 27
 Hepatitis-D-Virus 153
 Herbizidresistenz 394f
 Herceptin 176f
 Herpes-simplex-Virus (HSV) 417
 Herpesvirus 26, 494
 Heterochromatin 7, 46, 233f
 – fakultatives 233f
 – konstitutives 233
 heterologe Proteine 12
 Heteroplasmie 445, 628
 Hexon 458
 His6-Tag 83, 279
 Histon 5–7, 46
 Histonacetylierung 532f
 Histon-Acetyltransferase (HAT)
 46
 Histon-Deacetylase (HDAC) 46
 HIV 25, 158, 573–579
 – Corezeptoren 575f
 – mögliche Schritte der Hemmung
 577
 – Quasispezies 576
 – Resistenz von 638
 – Resistenz gegen 575
 HLA, siehe MHC-Rezeptor
 HLA-System 617
 Hochdruckflüssigkeits-
 chromatographie, siehe
 Hochleistungsflüssigkeits-
 chromatographie
 Hochleistungsflüssigkeits-
 chromatographie 269–271
 Hochsicherheitslaboratorium 593
 homologe Cosuppression 431
 Homoplasmie 445
 Hormon 500
 Hormonrezeptorenfamilie 503
 HPLC, siehe Hochleistungsflüssig-
 keitschromatographie
 humaner Faktor IX 427
 humanes Choriongonadotropin
 (hCG) 182
 humanes Herpesvirus-8 (HHV-8)
 494
 humanes Immundefizienzvirus,
 siehe HIV

humanes Leukozytenantigen
 (HLA), siehe MHC-Rezeptor
 Humangenomprojekt 226, 232f
 humorale Immunität 170
 Hybriddysgenese 421
 Hybridisierung, subtraktive 82–85
 Hybridomzelle 174f
 Hydrolase 318
 Hydroxyharnstoff 579

I

IBP, siehe isolatorbindendes
 Protein
 Identität, genetische Grundlage
 614f
 IGF-1 470
 Immunantwort, Apoptose 544
 Immuncytochemie 184
 Immunglobulin 170
 – Funktion 172–174
 – Immunglobulin G 172–174
 – Struktur 172–174
 Immunhistochemie 184
 Immunität
 – erworbene 170
 – humorale 170
 – spezifische 170
 – zellvermittelte 170
 Immunitätsprotein 11
 Immunoassay 290f
 immunologisches Gedächtnis 187
 Immunsystem 168
 Immuntechnologie 167–198
 IMPACT-System 281–283
 Impfstoff 168, 187–198
 – Attenuation 187–189
 – DNA-Impfstoff 194–196
 – essbarer Impfstoff 196–198
 – Herstellung 187–189
 – Identifizierung neuer Antigene
 192–194
 – oraler Impfstoff 196–198
 – Peptidimpfstoff 189
 – reverse Impfstoffentwicklung
 191f
 – Spaltimpfstoff 189
 – Vektorimpfstoff 190f
 – Vollimpfstoff 187f
 Impfung 187
 – Nebenwirkungen 197
 – siehe auch Schutzimpfung,
 Impfstoff

- imprinting*, siehe Prägung
inaZ-Gen 360
 Indigo 361f
 Indol 361f
 Induktor 39
 induzierbarer endogener Promotor 416
 Infektion
 - alternative Behandlungsmethoden 556
 - Ausbreitung 592
 - bakterielle 551–566
 - Inkubationszeit 591f
 - Mechanismen 552
 - mit Prionen 580–585
 - mit Viren 567–579
 - Persistenz der Erreger 592
 Influenza, Behandlungsmöglichkeiten 573
 Influenzavirus 570–573
 - Aufbau 571
 - Austausch von RNA-Segmenten 573
 - Entwicklungszyklus 572
 - Hauptgruppen 571
 - Varianten 571
 - Virulenz 571
 Initiatorregion 37
 Inkubationszeit 591f
in planta-Transformation, siehe Floral-dip-Methode
 Insekten, transgene 421f
 Insektenresistenz 396f
 Insektenzellen 22
 - Proteinexpression 310f
 Insertion 241, 398
 Insertionsinaktivierung 71f
 Insulin 384, 508f
 - ausgelöste regulatorische Kaskaden 510
 - Funktionen im Fettstoffwechsel 516–518
 - gentechnische Herstellung 511–513
 - Klonieren in Form von Minigenen 511f
 - modifiziertes 512f
 - Prozessierung 509
 Insulinrezeptor 509–511
 Insulinsignalübertragung 531
 Integrase (*intI*) 345, 26
 Integrin 332
 Integron 344–346
 Integronanalyse 344–346
 Intein-Tag 281f
 Interferon 569f
 Interleukin 465
 Interleukin-4 (IL-4) 605
 Interphase 46
 interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) 568f
 Intron 48, 80, 149, 234–236
 Invasin 556
 Inversion 241
 Invertase 241
in vivo-induzierte Antigen-technologie (IVIAT) 194f
 Inzesttabu 437
 Ionenaustauschchromatographie 270
 Ionenkanal als Nanosensor 215–218
 Ionenkanalaktivierung 502
 IPTG 41
 - Struktur 41
 IRES-Element 314
 isoelektrische Fokussierung 265
 Isolator 43
 isolatorbindendes Protein (IBP) 43
 Isolatorsequenz 413f
- J**
 Jeffreys, A. 621
 Jenner, E. 188
 JNK 45
 Jun 44f
junk DNA 171, 235–238
- K**
 Kac, E. 642
 Kalluskultur 382f
 - Pflanzenzelle 382f
 Kappa-Partikel 589
 Karzinogen 476–478
 Katalase 529
 Keimbahnzelle 12f
 Keimzelle 240
 Kernhülle 14
 Kernpore 14
 Kernresonanzspektroskopie 292
 Kernrezeptor 503
 - Probleme und ethische Fragen 428
 Kettenabbruchsequenzierung 102–106
 Ketteterminator 578
 Kinesin 223
 Klade 242
 Kladistik 242
 Klammerbeladungskomplex 91
 Klasse-I-MHCs 170
 Klasse-II-MHCs 170
 Klenow-Polymerase 106
 Klonen
 - Bioethik 632
 - durch Grenzwertverdünnung 308
 - eines Schafes, Schema 425
 - Entwicklungsprobleme 429
 - genetisches *Imprinting* 429
 - Menschen 644f
 - praktische Gründe für das Klonen von Tieren 426
 - Säugetiere 424–426
 Klonierungsplasmid 74
 Klonierungsvektor 71–75
 - Eigenschaften 71–73
 - Insertionsinaktivierung 71f
 - α -Komplementation 71–73
 - spezielle Typen 73
 Knockout-Maus 410
 - Erbdefekte 447
 - Untersuchung von Verhaltensanomalien 530
 kohäsive Enden 58
 kombinatorische Proteinbibliothek 330f
 kombinatorisches Screening 330
 komplementäre DNA (cDNA) 79f
 komplementäre Stränge 64–66
 α -Komplementation 71f
 konditioneller Knockout-Mutant 420
 Konjugation 28
 konservative Substitution 241
 Kontakthemmung 482
 Krebs 476–497
 - aggressive Gentherapie 467–469
 - Entstehung durch somatische Mutation 477
 - ererbte Anfälligkeit 492f
 - Gene 480f
 - Korrelation mit Altern 526
 - Stadien 476

- Therapie durch Immunprovakation 469
- Therapie mit Antisense-RNA 469f
- Therapie mit Nanopartikeln 211f
- Transformation 482
- Umweltfaktoren 476–478
- Krebsfrüherkennung 492
- Krebszelle, Auslösen der Apoptose 548f
- Kühe, transgene 409
- Kuhpocken 188
- künstliches Chromosom 74f
- Kunststoff, biosynthetischer 376f
- Kuru 580f
- kurze Haarnadel-RNA, siehe shRNA
- kurze interferierende RNA, siehe siRNA

L

- LacI-Repressor 416
- β -Lactam-Antibiotikum 372f
 - Biosynthese 372f
- Lactat-Dehydrogenase (LDH) 322
- Lactococcus lactis* 11
- Lactoferrin 556
- Lactose
 - Acetylase 39
 - Permease 39
 - Struktur 41
- Lactoseoperon 39–41
 - Komponenten 39
 - Regulation 40
- λ -Austauschvektor 74
- λ -Phage, λ -kohäsive Enden 73
- lange terminale Sequenzwiederholungen, siehe LTRs
- Latenz 25
- Leader-Peptidase, siehe Signalpeptidase
- LEAP-Methode 308
- Lectin 602
- Lentivirus 464
- Leptin 513–515
- Leptinrezeptor 514
 - alternative Form 515
- Letalfaktor (LF) 563
- Leucin-Zipper 44, 179, 181
- Ligase 58–60
- Lignin 358

- LINE 236f
- Linearschrittmotor 223
- Linker 73
- Lipofektion 466f
- lipophiles Hormon 503f
 - Struktur 503
- Lipoprotein 169
- Liposom 131f, 466f
- Listeria monocytogenes* 11
- live cell-Microarray 148
- Locuskontrollregion (LCR) 413f
- lokaler Mediator 500
- long terminal repeats, siehe LTRs
- LOS-Syndrom 429
- LTRs 25, 236, 463
- luc-Gen 256, 390
- Luciferase 256, 258, 390
 - als Reporter in Pflanzen 390
- Luciferin 256, 390
- Lumi-Phos 64
- lux-Gen 256
- lysogenes Virus 560
- Lysogenie 25
- Lysozym 56
- lytische Phase 25

M

- Macrolid 374
- Magnetosom 214
- Makrophage 542f
- Malaria 422–424, 471
- MALDI-TOF 273–275
- Maltose-bindendes Protein (MBP) 279
- MAO-A-Gen 520f
- Marathon-Maus 408
- Marburg-Virus als Biowaffe 598
- MAR-Protein 7
- Masernvirus 497
 - als onkolytisches Virus 496
 - natürliche Rezeptoren 495
- Massenspektrometer, Aufbau 275
- Massenspektrometrie 273–279
 - Peptidsequenzierung 276f
 - Proteinidentifizierung 273–275
 - Proteinquantifizierung 277f
- MAT-Locus 17
- Matrixanheftungsregion, siehe MAR-Protein
- matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) 273–275
- Matrizenstrang 32
- Maus 21
 - Genom 226, 235
 - transgene 408
 - und Wachstumshormon 407f
- Mäusepocken 605f
- Maus-Leukämievirus, siehe murines Leukämievirus
- MCS, siehe Polylinker
- Mediatorkomplex 43
- Melanocortin 517f
- Melanocortinrezeptor 517f
- Mendel, G. J. 4, 380
- Mensch
 - Genom 232–238
 - Karte der mitochondrialen DNA 447
- menschliches Genom 232–238
 - Analyse 234f
- MERRF-Syndrom 445
- Metabolom 292f
 - Analyse von Erdbeeren 293
- Metabolom-Fingerprinting 292
- Metabolomik 292f
- Metagenombibliothek 338, 342–348
 - Analyse auf Funktionen 346–348
 - Microarrays 344
- Metagenomik 336–351
 - Antibiotika 348f
 - Ökologie 348f
 - sequenzabhängige Techniken 342–346
 - Symbiose 348
- Metalloprotease 271f
- Metallothionin-Promotor 470
- Metastase 491f
- Methioninsulfoximin 313
- Methotrexat 313
- methylcytosinbindendes Protein 46
- Methylierung 46f, 93, 255
 - Störungen 442–444
- Methylobium petroleophilum* PM1 350
- Methyl-*tert*-butylether (MTBE) 350
- MHC-Rezeptor 170
- Microarray 248–253
 - Hefe 250
- Microbead 196

- microfluidic* 223
2-micron circle 308
 Mighty Mouse 408
 Mikroinjektion 131, 133, 406f
 MikroRNA 123, 134, 138
 Mikrosatelliten-Polymorphismus 227
 Mikrotumor 476
 Milzbrand 592
 – als Biowaffe 594–596
 – Anschlag in den USA 2001 596
 – Bioterrorismus 591
 – Hauptformen 596
 – Letalfaktor 563
 – Ödemfaktor 563
 Milzbrandtoxin 563f
 – protektives Antigen 563
 Minisatellit 238
 Minos-Transposon 423
 Minusstrang-RNA-Virus 570f
 miRNA
 – Genexpression 138
 – siehe auch MikroRNA
 Missense-Mutation 241
 mitochondriale Defekte 445–447
 mitochondriale DNA (mtDNA)
 445–447, 625f
 – genealogische Forschung 626
 – Karte 447
 – Oxidation 528f
 – Stammbaumerstellung 54, 626
 Mitochondriengenom 445–447
 Mitochondrium 54, 445–447
 – Altern 528f
 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) 480
 MNPV 310f
 mobile DNA 28
 Modifikationsenzym 58
 molarer Extinktionskoeffizient 209
 Molekül, Biosynthese 368
 Molekularbiologie, forensische 613–628
 molekulare Phylogenetik 242–245
 molekulares Chaperon 303
 Molekülmassenstandard 57
 Monoamin-Oxidase 520f
 monoklonale Antikörper 174f
 – Humanisierung 175f
 Morpholino-Antisense-Oligonucleotid 124, 126
 mRNA (Messenger-RNA) 32, 47, 53f, 79f, 84, 113, 120f
 – Eukaryoten 47f, 53f
 – monocistronische 35f
 – polycistronische 35f
 mRNA-Prozessierung, Eukaryoten 47f
 mtDNA, siehe mitochondriale DNA
 Mucoviscidose, siehe cystische Fibrose
 Multigendefekt 438
 multigenes Merkmal 614
 multiple Klonierungsstelle 286
 – siehe auch Polylinker
 Multiplex-PCR 622f
multiwell-Platten-Assay 148f
Murex brandaris 361
Murex trunculus 361
 murines Leukämievirus (MuLV) 464
Mus musculus, siehe Maus
 Muskeldystrophie 450–452
 Mutagenese
 – gezielte 116f
 – mit schnellen Neutronen 399f
 Mutation 240
 – dominante 439f
 – dominant-negative 439
 – dominant-negative bei bakteriellen Toxinen 564f
 – dynamische 440–442
 – Funktionsänderung 439f
 – Funktionsgewinn 429f
 – Funktionsverlust 439
 – konditionale 241
 – Onkogen verursachende 483f
 – somatische 13f, 476
 – temperatursensitive 241, 530
 Mutations-Hotspot 241f
 Mutationszüchtung 380f
 Mutatorgen 492f
 Mutterkornpilz, siehe *Claviceps purpurea*
 Mx-Protein 569
Mycobacterium tuberculosis 558
myc-Onkogen 486f
Mycoplasma 49, 234
 Myc-Protein 486f
 Myc-Tag 83
 Myelom 174f
 Myoglobin 244
 myotone Dystrophie 437, 443
- N**
 NAD 321f
 NADP 321f
 Nann, T. 208
 Nanobiotechnologie 199–224
 – DNA 218–222
 – Gentechnik 218f
 Nanokabel 215f
 Nanokapsel 211
 Nanokristall 212
 Nanomaschine 200
 – DNA 219f
 Nanopartikel 207–212
 – Anwendung 207f
 – Arzneistoffe 211
 – Aufbau 208
 – DNA 211
 – Halbleiter 210f
 – Krebstherapie 211f
 – Markierung 208
 – RNA 211
 Nanophobie 636
 Nanoröhrchen 212f
 Nanoschicht 215
 Nanostäbchen 208
 Naphthalin 361f
 – Oxygenase 361f
 Napoleon 646
 NARP-Syndrom 445
 Natriumdodecylsulfat (SDS) 264
 natürliche Transgenese 432
 natürlicher Farbstoff 361f
 Nebenwirkungen 332
Neisseria meningitidis 191
 Nekrose 534f
 Neomycin-Phosphotransferase 389f
 Nervensystem 544f
 Nervenwachstumsfaktor (NGF) 544f
 neuritische Plaques 545f
 Neurofibrillenbündel 545
 Neuron 500f, 544f
 Neuropeptid Y 514f
Neurospora 120f, 136
 Neurotoxin, Botulinustoxin 600f
 Neurotransmitter 501
 neurotropher Faktor 544f
 Nicht-Fimbrienadhäsion 555

nichtinfektiöse Krankheit 499–522
 nichtnucleosidischer Reverse-
 Transkriptase-Inhibitor
 (NNRTI) 576, 578
 3'-nichttranslatierte Region 33
 5'-nichttranslatierte Region 33, 51
 nichtvirale Gentherapie 465f
 Nicotin 519
 Nitrocellulose 267
 Nomarski-Interferenzkontrast-
 mikroskop 535
 Nonsense-Mutation 241
 Noradrenalin 514f, 520
 Northern-Blot 67
 nosokomiale Infektion 176
 NO-Synthetase 507
 Nucleinsäure 3–8, 49, 60–64
 – chemische Markierung 63f
 – Fluoreszenz 63
 – Nachweis 60–64
 – radioaktive Markierung 60
 – Struktur 6
 – Verpackung 3–8
 Nucleocapsid 571
 Nucleosid 98–102
 Nucleosidanalogon 576, 578
 Nucleosom 5, 46
 Nucleotid 3, 98–102
 nullizygoter Zustand 487

O

Oberflächenantigen 185
 Obestatin 518
 ob-Gen 513f
 Ödemfaktor (EF) 563
 offenes Leseraster (ORF) 33, 345
 Okazaki-Fragmente 88f, 92
 Okklusionskörper 310
 Ökologie, Metagenomik 348f
 Oligonucleotid 98–102, 469, 471
 – Microarray 250–252
 Oligonucleotidsynthese 101, 252
 Onkogen 480f
 – durch Mutation entstanden 483f
 – Nachweis durch Transformation
 482
 – virales 481f
 onkogenes Virus 481f
 Oocyte 445
 Operon 35
 Opin 386
 opportunistischer Infekt 573

oralen Impfstoff 196–198
 O'Reilly, H. 642
 ORF, siehe offenes Leseraster
 Organellengenom 245
 Organtransplantation 636f
 Orthomyxovirus 570
Oryza sativa, Genom 235
 Östradiol 503
 Oxidationsschäden als Ursache
 des Alterns 528f
 Oxygenase 361

P

Papillomvirus 494
Paramecium 234, 589
 Paramyxovirus 495f
 Partikelkanone 388f
 Pathogen
 – Eignung zur biologischen
 Kriegsführung 594
 – Entstehung eines neuen 554
 – gentechnische Modifikation
 604–606
 Pathogenitätsinsel 554
 pBAD-Expressionssystem 300, 302
 PCR, siehe Polymeraseketten-
 reaktion
 P-Element 421f
 Penicillin 372
Penicillium camemberti 14
Penicillium candidum 14
Penicillium caseicolum 14
Penicillium chrysogenum 372
Penicillium notatum 14, 372
Penicillium roqueforti 14
 Penn, W. 645
 Penton 458
 Pentose 3
 Peptid, Sequenzierung mit
 Massenspektrometrie 276
 Peptidase, siehe Protease
 Peptidimpfstoff 189
 Peptidnucleinsäure (PNA) 124,
 126
 Peptidyltransferase 51
 Pest 590
 PEST-Sequenz 302
 pET-Proteinexpressionssystem
 300f
 Pflanze
 – funktionelle Genomik 398–402
 – gentechnische Veränderung 383f

– Klonierung 382f
 Pflanzenbiotechnologie 379–404
 Pflanzenhormon 382
 Pflanzenschädlinge 396
 Pflanzenzelle
 – Kalluskultur 382f
 – Protoplast 382
 – Suspensionskultur 382f
 Pflanzenzüchtung 380f
 pflanzliche Gewebekultur 381–383
 Phage, siehe Bakteriophage
 Phagen-Biopanning 346–348
 Phagen-Display 212, 283–285
 – Bibliothek 283–285
 – Nanokabel 212f
 – Prinzip 284
 Phagocytose 542
 Phänotyp 4f, 614
 Phänotypkatalog 149
 Phänotypsignatur 149
 Pharmakogenetik 245–260
 Pharmakogenomik 246
 Phasenvariation 241
 Phenol 56
 Phenylalanin-Hydroxylase 452
 Phenylketonurie (PKU) 437, 452f,
 643
 Pheromon 500
 Philip, Herzog von Edinburgh 628
phoA-Gen 256
 Phosphatgruppe 60
 Phosphatidylserin 542
 Phosphodiesterase-5 (PDE-5) 508
 Phospholipase 423
 Phosphoramidit 99f
 Phosphordiamidatbindung 124
 Phosphorelay-System 42
 Phosphorothioat 60, 126
 – Oligonucleotid 124
 Phosphotransferasesystem (PTS)
 501f, 505
 Photolithographie 251
 Photolyase 160
 phylogenetischer Baum 243–245
 Phytoremediation 399
 Picornavirus 568f
 piezoelektrische Keramik 204
piggyBac-Transposon 423
 Pilin 555
 Pilus 555f
 – Aufbau 555
 Pilze 13f

- als Biowaffe 603f
- in der Biotechnologie 13f
- Pinocytose 131
- Plaque 25
- Plasmid 11f, 71–73, 297, 304f
- Plasmid-DNA 56
- Plasmidinkompatibilität 76
- Plasmodium falciparum* 422–424, 471
- als Biowaffe 594
- Entwicklung 423
- PMCA-Technik 582f
- Pocken 188
- Pockenvirus 190, 598
- als Biowaffe 598
- Umgehen des Immunsystems 605
- poison sequence* 606
- Polio 196
- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 105, 264–266
- Poly(A)-Schwanz 48
- polychloriertes Biphenyl (PCB) 364f
- Polyglutaminbereich 440f
- Polyhedrin 310f
- Polyhistidin-Tag 279
- Polyhydroxyalkanoat (PHA) 376f
- Polyhydroxybutyrat (PHB) 376
- Polyhydroxyfettsäure 376
- Polyketid 373–376
- Polyketidantibiotikum 373–376
- Polyketidweg 373–376
- Modifikation 374–376
- Prinzip 374
- polyklonale Antikörper 174
- Polylinker 71, 286
- Polymerasekettenreaktion (PCR) 8, 106, 158, 621f
- in der Forensik 621–623
- gezielte Mutagenese 116f
- in der Gentechnik 114–117
- inverse 111f
- Modifikationen 110–112
- *overlap*-PCR 114f
- Reverse-Transkriptase-PCR 113
- Polypeptidkette, Modifikationen bei Eukaryoten 306f
- polyploid 12
- Polysaccharid 169
- Polysom 53
- polyvalenter Inhibitor 564f
- positional cloning* 448
- Positionseffekt-Variation (PEV) 234
- posttranskriptionelles Gen-Silencing 136
- Prader-Willi-Syndrom 442–444
- Prägung 46
- Prä-MikroRNA 138
- Prä-mRNA 149
- Prä-Proinsulin 509
- Präsenilin 545
- PriA 91
- Primärtranskript 48
- Primase 91
- Primer 91, 102, 106, 115
- degenerierte 111
- Prion
- Filtern 583
- Hefe 584f
- Konformationsänderung 580
- Nachweis eines pathogenen 581–583
- RNA-Interferenz 583
- Wirkstoff gegen 580f
- Prion-Infektion 580–585
- Behandlung 583f
- Prion-Protein (PrP) 580
- Prodrug 467f
- Proghreltin 518
- Proinsulin 509
- Prokaryot 51, 94
- DNA-Replikation 94–97
- Translation 51f
- Promotor 33, 46, 81f
- induzierbarer 386
- konstitutiver 386
- Prophage 25
- Protease 26, 38, 271f
- Protease-Inhibitor 578f
- Protein 31–54
- antivirales 569f
- Bindungsspezifität 321f
- Blockieren mit RNA 471f
- Disulfidbindungen 319f
- α -Helix 321
- hydrophober Kern 320f
- Identifizierung durch Massenspektrometrie 273–275
- industrielle Nutzung 318
- Konformationen 320
- Konformationsänderung durch Prionen 580
- Modifikationen bei Eukaryoten 306f
- Prionen 580
- Quantifizierung durch Massenspektrometrie 277f
- rekombinantes 295–315
- Stabilität 300–303, 319–321
- Strukturgerüst 322f
- Tertiärstruktur 319
- toxische Wirkung durch Überproduktion 300
- Überaktivierung 485f
- Verdau 271f
- Western Blotting 267f
- ρ -Protein 35
- p16-Protein 490
- p21-Protein 490
- p53-Protein 489–491, 526
- Rolle 490
- Protein A 279
- Protein-Array 289–292
- Prinzip 291
- Screening 292
- Proteinase, siehe Protease
- Proteinbibliothek, kombinatorische 330f
- Protein-Engineering 317–333
- Bindungsproteine 332f
- Biomaterialien 331f
- Medizin 331–333
- Neukombination von Domänen 326–328
- nicht natürlich vorkommende Aminosäuren 324–326
- Proteinexpression
- in Bakterien 297–305
- in Eukaryoten 306–314
- in Hefezellen 306–309
- in Insektenzellen 310f
- in Säugetierzellen 311–314
- mehrere Untereinheiten 313f
- Vergleich der Systeme 314f
- Proteinglykosylierung 311f
- Protein-Interaktom 285
- Proteinkinase 501
- Proteinkinase A (PKA) 506
- Proteinsekretion 303–305
- Proteinstruktur 220–222
- kontrollierte Veränderung 220–222
- Proteinsynthese 49–53
- Protein-Tag 81f

Protein-Tagging 278–283
 protektives Antigen (PA) 563f
 – Aktivierung 564
 proteolytische Kaskade 535–538
 Proteom 264
 – Muster-Diagnostik 280
 Proteomik 263–293
 Protoonkogen 481
 Provirus 25
 Pseudogen 234
Pseudomonas 212, 360f
 – *diminuta* 373
 – *putida* 12
 – *syringae* 360
 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) 57f
 PUMA 526
 Purin 3
 Purpur 361f
 Pyrimidin 3

Q

Quantenausbeute 209
 Quanteneinschluss 210f
 Quantenpunkt 209
quelling 136
 Quorum-sensing-Molekül 349

R

Radiation-hybrid-mapping 230
 Radikalsubstitution 241
random shuffling library 330
random splicing library 331
 Rapamycin 462f
 RAPD, siehe zufällig vervielfältigte polymorphe DNA
ras-Onkogen 485f
 Ras-Protein 485f
 – Funktion 485
 Rasterkraftmikroskop (RKM) 202, 204–206
 – Nachweis von Viren 205f
raster-scan 201
 Rastersondenmikroskop (RSM) 201f
 Rastertunnelmikroskop (RTM) 202f
 – Prinzip 203
 RdRP, siehe RNA-abhängige RNA-Polymerase
 reaktiver Sauerstoffmetabolit (ROM) 525

rechtsgängige Helix 3
 REGS, siehe restriktionsenzym-generierte siRNA
 Reis, Genom 235
 rekombinante Plasmide 12
 rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator (rt-PA) 410
 rekombinantes bovines Somatotropin (rBST) 409
 rekombinantes humanes Somatotropin (rHST) 408
 rekombinantes Promotorsystem 416f
 rekombinantes Protein 295–315
 Rekombination
 – homologe 190
 – sequenzspezifische 419–421
 Religion und Wissenschaft, Konflikt von 651f
 Reovirus 26
 Replikation
 – DNA 88
 – Einzelstrangbrüche 92
 – Folgestrang 88f
 – Leitstrang 88f
 – semikonservative 88
 θ -Replikation 94
 Replikationsgabel 88
 Replikationsursprung 11, 28, 88, 91
 replikative Seneszenz, siehe zelluläre Seneszenz
 Replikator 222
 Replikon 27
 Replisom 91
 Reportergen 256
 – in Pflanzen 398
 Repressor 41
 Repressorprotein 38
 Restriktionsendonuclease, siehe Restriktionsenzym
 Restriktionsenzym 58f, 77
 restriktionsenzymgenerierte siRNA (REGS) 145
 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus 226f
 – siehe auch RFLP-Analyse
 Restriktionsschnittstelle 77
 Retina-Scan 614f
 Retinoblastomgen (*Rb*-Gen) 488
 Retinoblastomprotein 526

Retinsäure 503
 Retrovirus 25–27
 – Genom 26, 463
 – Gentherapie 463f
 – Lebenszyklus 27
 – Vektorsystem 463f
 – Verpackungskonstrukt 464
 – Verpackungssignal 463f
 – zur Produktion transgener Tiere 411
 reverse Impfstoffentwicklung 191f
 Reverse Transkriptase 25f, 113
 – RT-PCR 113
 Rezeptor 501f
 rezessive Mutation, Vererbung 436
 RFLP-Analyse 61
 – siehe auch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
 Rhinovirus 568
Rhodobacter, Codongebrauch 299
Rhodococcus 349f, 366–368
 – *dszABC*-Operon 366
 Ribonuclease (RNase) 56
 Ribonucleinsäure, siehe RNA
 Ribonucleoprotein (RNP) 237
 Riboschalter 160–163
 – Attenuation 161
 – gentechnische Veränderung 163f
 – Inhibition der Translation 161
 Ribose 3
 Ribosom 51
 ribosomale RNA (rRNA) 51, 242
 Ribosomenbindungsstelle (RBS) 298
 Ribosomen-inaktivierendes Protein 601–603
 – Wirkung 602
 Ribotyping 552f
 Ribozym 33, 120, 149–164, 430f, 472f
 – Biotechnologie 154f
 – Desoxyribozym 160
 – gentechnische Veränderung 163f
 – Gentherapie 472f
 – *in vitro*-Evolution 157–159
 – *in vitro*-Selektion 157f
 – Ligationsreaktionen 149
 – Medizin 154f, 158–160
 – RNA-SELEX 155f
 – Spaltungsmechanismus 151
 – Spaltungsreaktionen 149
 Ricin 602f

- Prozessierung 603
- Ricinus communis* 602f
- Rinderwahnsinn, siehe Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)
- Ring-Dioxygenase 368
- RISC, siehe RNA-indizierter Silencingkomplex
- RISC-Enzymkomplex 398f
- RNA 3, 31–54, 120, 134–138
 - replikative Form 25
 - Synthese 34f
 - Transport mit Nanopartikeln 211
- RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) 134
- RNA-Funktionsgewinn 443
- RNAi
 - Bibliothek 144–149
 - Bildung von Heterochromatin 137
 - funktionelles Screening 144–149
 - Hc-Pro 138
 - Pflanzen und Pilze 136
 - Säugetiere 141–144
- RNA-indizierter Silencingkomplex (RISC) 134
- RNA-Interferenz 430
 - Anwendungsmöglichkeiten in der Transgenik 431f
 - Konstrukte 432
 - siehe auch RNAi
- RNA-2'-O-Methyl 126
- RNA-Polymerase 32, 34f, 38
 - Core-Enzym 33f
 - σ -Untereinheit 33f
- RNA-Polymerase I 36
- RNA-Polymerase II 37, 43
 - allgemeine Transkriptionsfaktoren 37
- RNase H 120
- RNA-SELEX 155–157
 - Ribozym 155f
- RNA-SIP 339
- RNA-Technologie 119–165
 - Anwendung in der Transgenik 430f
- RNA-Virus 606f
 - als Biowaffe 607
 - Expression eines klonierten 607
- Rohrer, H. 202
- rolling circle-Replikation 95
- Romanow, G. 628
- Romanow, N. A., siehe Zar Nikolaus II
- Romano-Ward-Syndrom 439f
- Rous-Sarkom-Virus (RSV) 416, 494
- RT-PCR, siehe Reverse-Transkriptase-PCR
- RU486 418
- Rückkreuzung 393
- RXR-Protein 504
- S**
- Saccharomyces cerevisiae* 14
 - Genom 235
- Safran 384
- Sanger, F. 102
- Sargasso-See 344
- Sarkom 494
- Satellitenvirus 27, 151
- Säugetier
 - Apoptose 538–541
 - Klonen 424–426
 - Proteinexpression 311–314
- Säugetier-Shuttle-Vektor 311, 313
- scFv, siehe Einzelketten-Fv
- Schilddrüsenhormon, siehe Thyroxin
- Schmelztemperatur (T_m) 319
- schnelles Neutron 399
- Schutzimpfung 197
- Schwangerschaft
 - ELISA-Assay 182f
 - genetische Untersuchungen 643f
- Schwangerschaftsabbruch 643f
- Schwangerschaftstest 183
- Schwarzer Tod 590
- Schweizer, E. K. 202
- SCID 464f
 - Gentherapie mit Retroviren 464f
- scrape-loading 131, 133
- Scrapie 580
- SDS-PAGE 264
- second messenger 502
- Segregation 4
- Sekretionssystem, allgemeines 304f
- sekundärer Bote 502
 - cAMP 504–506
 - Stickstoffmonoxid 507
 - zyklisches GMP 507
- Selbstspießen 151f
- SELDI-Massenspektrometrie 275
- selektierbarer Marker (Selektionsmarker) 386f
 - Entfernen 391f, 419
- selektive Züchtung 406, 645–648
 - Hunderassen 647
- semikonservative Replikation 88
- Seneszenz
 - aktivierende Faktoren 525
 - DNA-Schäden 525
 - Telomerverkürzung 525
 - vorzeitige 525
 - zelluläre 524f
- Sensorkinase 41
- sequence tagged site (STS) 228
- Sequenzalignment 243
- sequenzspezifische Rekombination 419–421
- Serinprotease 271f
- Serin-Transacetylase 427f
- Serotonin 520
- Sfiris, Gräfin X. 628
- Shigella dysenteriae* 601
- Shine-Dalgarno-Sequenz 51, 298
- shotgun-Sequenzierung 231–233
- shRNA 142
 - Bibliothek 146–148
- Shuffling 171
- Shuttle-Vektor 73f
- Sichelzellanämie 437
- Siderophor 556–558
- Signalpeptidase 303
- Signaltransduktionsprotein 484
- Signalübertragung 501f
 - Haupttypen 501f
- Signalübertragungsprotein 501f
- Silberfärbung 265
- Sildenafil 508
- Silencing 46f
- simianes Virus 40 (SV40) 312, 416, 494
- SINE 237f
- Single Base Extension (SBE) 246f
- siRNA 134, 141, 398
 - Bibliothek 145–148
- Sirtuin 532f
- Sirtuininhibitor 532f
- SLUG 526
- Smart Mouse 408
- SNP 227f, 246
- Snyder, M. 291
- somatische Mutation 13f

- somatische Zelle 12f, 240
 Somatotropin 407f
 Sondenmolekül 66
 Southern-Blot 66f
 Spaltimpfstoff 189
 Spanische Grippe 571
 spezifische Immunität 170
 Spindel 96
 SPIO-Nanopartikel 209
 Spleißen 127f
 – Selbstspleißen 151f
 Spleißfaktoren 48
splice junction array 254
Spodoptera frugiperda 22
 Spongiforme Encephalopathie 581
 Sporozoit 423
 ssDNA 219
 ssu-rRNA 339, 552
stable isotope probing (SIP) 339f
 Stammbaum, siehe phylogenetischer Baum
 Stammzelle 13, 411f, 524f
 Stammzellenforschung 644
 Stammzelltherapie, Diabetes 511
 Stanol 371
Staphylococcus 245
 – *aureus* 11, 176
 Stärke 356–358
 – Abbau 356–358
 StarLink Mais 402
 Stechmücken, genetisch modifizierte 422–424
 Sterin 368, 371
 – Derivate 371f
 – Modifikation 368, 371f
 – Synthese 368
 – therapeutischer Einsatz 371f
 Steroid 371, 503f
 Steroidhormon 503f
 Steroidrezeptor 504
 – Aktivierung 504
 Sterol, siehe Sterin
 Stickstoffmonoxid 507f
 Stoffwechsel-Engineering 353–377
 – Abspaltung von Halogen-, Nitro- und Sulfonatgruppen 364f
 – Celluloseabbau 358f
 – Entschwefelung 366–368
 – integrierter Regulationskreis 369f
 – Modifikation des Tol/Xyl-Abbauwegs 363–365
 – Modifikation von Polyketidwegen 374–376
 – Stärkeabbau 357f
 – Sterinmodifikation 371f
 – Verbesserung von Nutztieren 427f
 – Verhindern von Eisbildung 359f
 – Xylosenutzung 355f
 Strangverschiebung 242
 Strep-Tag 279
 Streptavidin 179, 292
Streptococcus 179
 Streptolysin O 131f
Streptomyces 234
 – *coelicolor* 12
 – Herbizidresistenz 395
 Streptomycin 337
 Stresstoleranz 397f
Strongylocentrotus purpuratus 260
 subtraktive Hybridisierung 82–85
 subvirale Agenzien 151–153
 subvirale infektiöse Agenzien 27–30
Sulfolobus 366
 Superoxid-Dismutase (SOD) 529
 Superspiralisierung 4, 88
 suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH) 340–342
 – *annealing* 342
 – Driver-DNA 342
 – Tester-DNA 342
 Suspensionskultur 21, 382f
 – Pflanzenzelle 382f
 SV40, siehe simianes Virus 40
 4S-Weg 366f
 Symbiose 348
 Synapse 500f
 Syncytium 421
 Szintillationszählung 62
- T**
 Tabakmosaikvirus 26
tac-Promotor 368
 TA-Klonierung 114
 Tandem-Massenspektrometrie 277
 Tandem-repeats 227
 – schädliche 440–442
Taq-Polymerase 106–108
 Targeting-Vektor 415
 TATA-Box 37
 Tau-Protein 545
 Taxonomie 242
 T-DNA 384–388
 – Exprimierung 385f
 – Übertragung 384f
 Telomer 95f, 525, 527f
 – extreme Verkürzung bei Krebs 527f
 – Verkürzung beim Altern 527f
 Telomerase 96, 527f
 temperatursensitive Mutation 530
 N-terminale Regel 302
 N-terminale Sequenz 302
 Terminator
 – ρ -abhängiger 35
 – unabhängiger 35
 Testosteron 503
tet-Operatorsequenz 417
tet-Operon 417
 Tetracyclin 374
 TetR-Repressor 416
 β -Thalassämie 127f
 therapeutisches Klonen 430
 Thermocycler 106f
 Thermogenin 519
 thermostabile DNA 8
Thermus aquaticus 106, 108
Thiobacillus 366
 Thiophen 366f
 Threoninprotease 271
 Thrombin 472
 Thymidin-Kinase 468f
 Thymin 3
 Thyroxin 503
 Tier, Klonen 424–426, 641
 Tierversuche 640f
 Tiling Array 253–255
 – menschliches Genom 254f
 TILLING 400–402
 Ti-Plasmid 384–388
 T-Lymphocyt 170
 – cytotoxische T-Zelle 170
 – T-Helferzelle 170
 Todesrezeptor 538f
 Todesrezeptorweg 538f
 TOL-Plasmid 361
 Toluol/Xylol-Abbauweg 363–365
 Topoisomerase I 4
 Topoisomerase IV 89f
 Totipotenzen 13, 424
 – Pflanzenzelle 381
 Toxin 588

- ADP-ribosylierendes 560
 - als Biowaffe 599
 - bakterielles 558f
 - Cholera 560–563
 - Milzbrand 563f
 - Transferrin 556
 - Transfer-RNA (tRNA) 49–51
 - Transformation 76
 - Transgen 381, 406
 - Aktivierung 419
 - Aktivierung durch Steroidhormone 418
 - Kontrolle der Expression 415–418
 - Position 392
 - Positionseffekte bei Expression 411–414
 - Vermeidung von Positionseffekten 413f
 - zielgerichteter Einbau 415
 - transgene Haustiere 429f
 - transgene Insekten 421f
 - transgene Kühe 409
 - Proteinherstellung 409
 - transgene Maus 408
 - transgene Menschen 429f, 648
 - transgene Nutzpflanze
 - Ethik 639f
 - Terminorttechnologie 640
 - transgene Pflanze 381
 - Allergien 402f
 - Einsatzmöglichkeiten 399
 - Herbizidresistenz 394f
 - Insektenresistenz 396f
 - Sicherheit 402f
 - Stresstoleranz 397f
 - Überprüfung 392–394
 - Züchtung 392–394
 - Zulassung 393
 - siehe auch Pflanzenbiotechnologie
 - transgene Primaten 429f
 - transgene Tiere 405–433
 - Amme 406
 - Entwicklungsprobleme 429
 - Erzeugung 406f
 - Ethik 641
 - Gründertiere 406
 - medizinische Forschung 410
 - Methoden zur Produktion 411
 - Mikroinjektion 406f
 - und Retroviren 411
 - Transgenic Art 642f
 - Transgenregulation über Steroidrezeptoren 417f
 - Transition 240
 - Transkription 32–34
 - ρ -abhängiger Terminator 35
 - Eukaryoten 36–38
 - Prokaryoten 35
 - Regulation 38, 42–46
 - Stoppsignale 35
 - ρ -unabhängiger Terminator 35
 - Transkriptionsblase 34
 - Transkriptionsfaktor 33, 37, 42f, 484
 - Domänen 42f
 - Transkriptionsstart 33
 - Transkriptom 248
 - Translation 32, 49–54
 - Elongation 51f
 - Eukaryoten 53f
 - Freisetzungsfaktor 51f
 - Initiation 52
 - Prokaryoten 51f
 - Termination 52
 - Translationsexpressionsvektor 298f
 - Translatom 264
 - Translokation 51, 241
 - Transmissible Spongiforme Encephalopathie (TSE) 580f
 - Transposase 29
 - Transposition 28–30
 - *cut and paste* 29
 - konservative 29
 - replikative 29
 - Transposon 28f
 - komplexes 29
 - Transversion 240
 - Trehalase 397
 - Trehalose 397f
 - Synthese und Abbau 398
 - Trehalose-6-phosphat-Phosphatase 397
 - Trehalosephosphat-Synthase 397
 - Trichoplusia ni* 22, 423
 - Triplet, siehe Codon
 - Trisomie-21 428
 - tRNA
 - Akzeptorarm 49–51
 - Anticodon 49–51
 - Tularämie als Biowaffe 597
 - Tumor 491f, 525
 - Bildung 491f
 - Metastasenbildung 491f
 - tumorinfiltrierender Lymphocyt (TIL) 467
 - Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF) 467
 - Tumorsuppressorgen, siehe Antionkogen
 - Turbomycin 337
 - Twort-Ribozym 150
 - Typhus 635
 - Typ-I-Sekretionssystem 304f
 - Typ-II-Sekretionssystem 304f
 - T-Zelle
 - Fusion 575
 - Infektion durch HIV 574f
 - siehe auch T-Lymphocyt
- U**
- Umkehrphasenchromatographie 270
 - Umweltbiotechnologie 336–351
 - Anreicherung der Kulturen 339–342
 - MTBE-Abbau 350
 - Schadstoffattenuation 349–351
 - Schwermetallabbau 350
 - Umweltprobe, Analysetechniken 343
 - Umweltprobleme 339–342
 - ρ -unabhängiger Terminator 35
 - Unabhängigkeitsregel 4
 - unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) 246
 - Uracil 3
 - 3'-UTR, siehe 3'-nichttranslatierte Region
 - 5'-UTR, siehe 5'-nichttranslatierte Region
- V**
- Vaccinia-Virus 190f
 - Variola-Virus, siehe Pockenvirus
 - Varkud-Satellitenribozym 153
 - Vaterschaftstest 617
 - vCJD 581
 - Vektorimpfstoff 190
 - Venter, C. 233, 344
 - Vererbung, rezessive Mutation 436
 - Verhalten, Einfluss von Genen und Stoffwechsel 520f
 - Verhaltensgenetik 520f
 - Verticillium* 212

Viagra, siehe Sildenafil
Vibrio cholerae 560–563
 – Regulation der Virulenzgene 561
 Victoria, Königin von Großbritannien 628
 Viktoria, Prinzessin von Hessen, Deutschland 628
 virales Onkogen 481f
 ViriChip 205f
 Virion 23
 Viroid 151f
 – Lebenszyklus 152
 Virospäre 336
 Virulenzfaktor 554
 Virulenzgen 553f
 Virulenzplasmid 554
 Virus 23–27, 95
 – als Biowaffe 598f
 – Formen 25
 – getarntes 606f
 – in der genetischen Forschung 23–27
 – krebsabtötendes 495–497
 – krebserregendes 493–495
 – Lebenszyklus 24
 – lysogenes 560
 – Nachweis mit Nanokabeln 215f
 – Nachweis mit Rasterkraftmikroskopie 205
 – onkogenes 481f
 – onkolytisches 495–497
 – Probleme beim Klonieren des Genoms 606
 – Stadien des Entwicklungszyklus 568
 – Wiegen 206
 – Wirkstoffe gegen 568f
 virusinduziertes Silencing 138
 Virus-Infektion 567–579
 – Therapie mittels RNA-Interferenz 570
 Virusoid 151

VNTR 227, 238
 – Fingerprinting 620f
 Vollimpfstoff 187f
 vorzeitige Seneszenz 526
 VP16-Aktivatorprotein 417

W

Wachstumsfaktor 484
 Waksman, S. 337
 Wasserstoffbrücken 64f, 88
 Wespen, biologische Kriegsführung 589f
 Western Blotting 267f
 – Protein 267f
 West-Nil-Virus 591
 WIN-Substanz 568f
 Wissenschaft und Religion, Konflikt von 651f
 Wobblepaarung 50

X

X-Chromosom 231
 Xenobiotikum 360
 Xenöstrogen 371, 504
 X-gebundene rezessive Krankheit 451
 X-Inaktivierung 46
 X-Phos 64
 Xylose 355f

Y

Y-Chromosom 626
yeast artificial chromosome 414
yeast two hybrid-System 43, 285
 – Analyse 288
 – Beuteprotein 286
 – Köderprotein 286
 – Prinzip 286
 – Reportergen 286
 – Vektoren für die Analyse 287
Yersinia pestis 554, 558
 – als Biowaffe 597
 – Bakteriocinproduktion 588

Z

Zar Nikolaus II 626–628
 Zarenfamilie
 – DNA-Test 626–628
 – Identifizierung 626–628
 – Stammbaum 627
 Zarin Alexandra 628
 Zebrafisch 20
 – Genomkarte 228
 Zelle
 – endgültige Differenzierung 524
 – Keimzelle 240
 – somatische Zelle 240
 Zellkommunikation 500f
 Zellkultur 21
 Zelloberflächenrezeptor 484
 Zellteilung 478f
 – Reaktion auf externe Signale 480
 Zelltod, programmierter, siehe Apoptose
 zelluläre Seneszenz 524f
 zellvermittelte Immunität 170
 Zellzyklus 478f
 – Blockierung durch p53 und p21 490
 – eukaryotischer 478f
 – Stadien 478
 zentrales Dogma der Molekularbiologie 32
 Zinkfingerdomäne 327f
 ZipCode-Analyse 246f
 Zocchi, G. 221
 Zoo-Blot 69
 zufällig vervielfältigte polymorphe DNA (RAPD) 112f
 zyklische Phosphodiesterase 508
 zyklisches AMP (cAMP) 504–506
 zyklisches GMP (cGMP) 507f
 Zyklussequenzierung 108
Zymomonas 355f